Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. A. M. Kellerer

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE TAGESZEITLICHER SCHWANKUNGEN DER ZELLPROLIFERATION IN DEN JEJUNUMKRYPTENEPITHELIEN DER MAUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Gisela Christine Herterich

aus Stuttgart

1982

Würzburg, den 22.10.1981

Aus dem Institut für Medizinische Strahlenkunde
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. A. M. Kellerer

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE TAGESZEITLICHER SCHWANKUNGEN DER ZELLPROLIFERATION IN DEN JEJUNUMKRYPTENEPITHELIEN DER MAUS

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Gisela Christine Herterich

aus Stuttgart

Würzburg, den 22.10.1981

Referent:	Professor Dr. med. B. Maurer-Schultze
Korreferent:	Professor Dr. med. H. W. Altmann
Dekan:	Professor Dr. med. K. A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

1. EINLEITUNG 1

2. MATERIAL UND METHODEN 3

2.1 Tiermaterial, Haltung und Ernährung der Tiere 3

2.2 Verwendete radioaktive Substanzen 3

2.3 Durchführung der Tierversuche 3

2.4 Herstellung von Krypten-Quetschpräparaten 4

2.4.1 Fixation 4
2.4.2 Feulgenfärbung 4
2.4.3 Quetschtechnik 4

2.5 Herstellung der Autoradiogramme 6

2.5.1 Aufbringen der 1. Emulsionsschicht, Exposition und Entwicklung 6
2.5.2 Aufbringen der inerten Zwischenschicht 7
2.5.3 Aufbringen der 2. Emulsionsschicht, Exposition und Entwicklung 8

3. AUSWERTUNG DER AUTORADIOGRAMME 10

3.1 Nulleffekt 10

3.2 Bestimmung der Zählgrenzen 10

3.3 Markierungsindex 14

3.4 Mitoseindex 14

3.5 Bestimmung der Zellflußrate in und aus der S-Phase mit Hilfe des Prozentsatzes rein 3-H- und rein 14-C-markierter Zellen nach Doppelmarkierung mit 3-H- und 14-C-Thymidin 15

4. ANWENDUNG DER DOPPELMARKIERUNGSMETHODE MIT ^{3}H- UND ^{14}C-THYMIDIN ZUM NACHWEIS TAGESZEITLICHER SCHWANKUNGEN DER PROLIFERATION DER KRYPTENEPITHELIEN 16

4.1 Verwendung der Doppelmarkierung mit 3-H- und 14-C-Thymidin 16

Seite

4.2 Prinzip der Doppelmarkierung mit 3-H- und ^{14}-C-Thymidin 16

5. ERGEBNISSE 19

5.1 Graphische Darstellung der verschiedenen gemessenen Parameter 19

5.2 Gesamtzellzahl 19

5.3 Mitoseindex 20

5.4 ^{3}H-Markierungsindex 20

5.5 ^{14}C-Markierungsindex 20

5.6 Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen 20

5.7 Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen 21

5.8 Quotient $\frac{\%\text{ rein }^{3}\text{H-markierter Zellen}}{\%\text{ rein }^{14}\text{-C-markierter Zellen}}$ 21

5.9 Statistik 21

5.10 Zusammenfassung der Ergebnisse 23

6. DISKUSSION 31

6.1 Literaturübersicht zur Untersuchung tageszeitlicher Schwankungen der Zellproliferation 31

6.1.1 Untersuchungen, die gegen das Vorliegen von tageszeitlichen Schwankungen in der Zellproliferation des Darmepithels sprechen 31

6.1.2 Untersuchungen, die für das Vorliegen von tageszeitlichen Schwankungen in der Zellproliferation des Darmepithels sprechen 33

6.1.3 Untersuchungen zu tageszeitlichen Schwankungen in der Zellproliferation anderer Gewebe 39

6.1.4 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Literatur 44

6.2 Zur Frage einer circadianen Rhythmik in der Proliferation der Jejunumkryptenepithelien der Maus in den vorliegenden Ergebnissen 47

Seite

6.2.1 Übereinstimmung der vorliegenden Ergebnisse untereinander und mit früheren Untersuchungen 47

6.2.2 Verhalten der verschiedenen zellkinetischen Parameter als Funktion des Tageszeit 48

7. ZUSAMMENFASSUNG 54

8. LITERATURVERZEICHNIS

9. TABELLEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543526_0041

Meinen Eltern gewidmet.

1. EINLEITUNG

Tageszeitliche Schwankungen des Mitoseindex, des ^{3}H-TdR-Markierungsindex sowie des ^{3}H-TdR-Einbaus wurden von einer Vielzahl von Autoren für verschiedene Säugetiergewebe berichtet. Aber gerade hinsichtlich tageszeitlicher Schwankungen der Proliferation des Dünndarm-Epithels sind die Ergebnisse kontrovers. Während einige Autoren über tageszeitliche Schwankungen der Proliferation des Darmepithels berichten (BULLOUGH, 1948; ALOV, 1963), haben andere Autoren solche Schwankungen nicht gefunden (KLEIN und GEISEL, 1947; LEBLOND und STEVENS, 1948; PILGRIM et al., 1963). Solche tageszeitlichen Schwankungen können entweder durch Änderung der Transitzeiten der Zellen durch bestimmte Zyklusphasen oder durch eine Änderung der Zahl der Zellen, die in eine Zyklusphase ein- bzw. aus derselben austreten, bedingt sein. Darüber hinaus können Änderungen der zellkinetischen Parameter auch auf einer Vergrößerung oder Verkleinerung des proliferativen Pools der Zellen, d. h. der Growth fraction, als Funktion der Tageszeit beruhen. Über eine Änderung der Dauer der Zellzyklusphasen oder der Zellflußrate in die S-Phase oder Mitose in Abhängigkeit von der Tageszeit wurden in den Arbeiten, die über tageszeitliche Schwankungen der Proliferation im Darmepithel berichten, nur Spekulationen angestellt. Änderungen der Flußraten im Tagesrhythmus sind für das Darmepithel bisher nie experimentell untersucht worden.

Erstmals haben GRUBE et al. (1970) und TVERMYR (1972) Flußraten am Anfang und Ende der S-Phase und in die Mitose mit Hilfe einer Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR bzw. mit zweimaliger ^{3}H-TdR-Gabe für die Rückenhaut der Maus gemessen. Beide Autoren fanden Unterschiede der Flußraten im Tagesrhythmus parallel zu Änderungen des Markierungsindex. Die Flußraten in und aus der S-Phase waren zu keiner Tageszeit gleich.

In der vorliegenden Arbeit wird die Flußrate am Anfang und Ende der S-Phase mit Hilfe einer Doppelmarkierung mit

^{3}H- und ^{14}C-TdR in Abhängigkeit von der Tageszeit für die Jejunumkryptenepithelien der Maus gemessen. Der Quotient der Zellflußrate in und aus der S-Phase sollte über den Tagesverlauf = 1 sein, wenn keine tageszeitlichen Schwankungen vorliegen. Das Verfahren der Zellflußratenmessung wurde vor allem deshalb gewählt, weil der Quotient weitgehend unabhängig von der Schwankung von Tier zu Tier ist. Besonders stark machen sich solche Schwankungen von Tier zu Tier im Mitoseindex bemerkbar. Auf der anderen Seite gibt der Markierungsindex tageszeitliche Schwankungen - falls solche vorhanden sind - nur relativ ungenau wieder, da auch hier die Schwankung von Tier zu Tier erheblich ist.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche ergaben Anhaltspunkte für das Vorliegen von Abweichungen des Quotienten der Zellflußrate am Ende und Anfang der S-Phase sowie des Mitoseindex vom Tagesmittel. Die relativ großen statistischen Schwankungen der Werte zu den verschiedenen Tageszeiten lassen jedoch eine eindeutige Aussage über das Vorliegen tageszeitlicher Schwankungen der Zellproliferation des Dünndarmepithels nicht zu. Sollten solche tageszeitlichen Schwankungen vorliegen, so sind sie jedenfalls nicht groß.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiermaterial, Haltung und Ernährung der Tiere

Die Versuche wurden mit insgesamt 40 männlichen weißen Mäusen des Stammes NMRI (Instituts-eigene Nachzucht) durchgeführt. Die Tiere hatten ein mittleres Körpergewicht von 39,8 ± 4,2 g und waren zwischen 8 und 12 Wochen alt. Sie erhielten Altromin^{R} und Wasser ad libidum. Zur Erzielung konstanter Umweltbedingungen wurden die Tiere bei einer Raumtemperatur von 23° C und künstlichem Lichtwechsel (hell von 6.00 - 18.00 Uhr, dunkel von 18.00 - 6.00 Uhr) gehalten.

2.2 Verwendete radioaktive Substanzen

Zur radioaktiven Markierung der DNA wurde Thymidin-Methyl-^{3}H (^{3}H-TdR, spezifische Aktivität 6700 mCi/mmol) und Thymidin-2-^{14}C (^{14}C-TdR, spezifische Aktivität 54,5 mCi/mmol) benutzt. Beide radioaktiven DNA-Vorläufer wurden von der New England Nuclear Corporation (Boston, USA) geliefert. Bis zum Verbrauch wurde das radioaktiv markierte TdR im Kühlschrank bei + 4° C aufbewahrt. Für die Versuche wurden die Substanzen mit physiologischer NaCl-Lösung so verdünnt, daß in 0,01 ml Lösung 8 µCi ^{3}H-TdR bzw. 0,16 µCi ^{14}C-TdR enthalten waren.

2.3 Durchführung der Tierversuche

Um 9.00 Uhr morgens wurden 4 nach dem Zufall ausgewählten Mäusen je 4 µCi ^{3}H-TdR/g Körpergewicht i.p. (Flüssigkeitsmenge: 0,005 ml/g Tiergewicht) und eine Stunde später je 0,08 µCi ^{14}C-TdR/g Körpergewicht (Flüssigkeitsmenge: 0,005 ml/g Tiergewicht) appliziert. 30 Minuten nach der ^{14}C-Injektion wurden die Tiere durch subcapitale Luxation der Wirbelsäule getötet, die Bauchhöhle eröffnet, ein ca. 2 cm langes Stück Jejunum 6 cm distal des Pylorus entnommen und sofort in das Fixationsmittel eingelegt. Das gleiche wurde alle 3 Stunden (12.00 Uhr, 15.00 Uhr, 18.00 Uhr etc.) über einen Zeitraum von 24 Stunden einschl. 9.00 Uhr des nächsten Tages wiederholt. Die Tierversuche während der Nacht wurden bei dunklem Rotlicht durchgeführt, um die Tiere in ihrem Tag-Nacht-

Rhythmus nicht zu stören. Zur Bestimmung der Zählgrenzen (s. Kap. 3.2) erhielten 2 Mäuse 4 µCi ^{3}H-TdR/g Körpergewicht und wurden 90 Minuten später getötet. 2 weitere Mäuse erhielten 0,08 µCi ^{14}C-TdR/g Körpergewicht und wurden 30 Minuten danach auf dieselbe Weise getötet.

2.4 Herstellung von Krypten-Quetschpräparaten

2.4.1 Fixation

Die Darmstücke wurden 24 bis 48 Stunden in einer Lösung, bestehend aus 3 Teilen Alkohol abs., 1 Teil Essigsäure und 0,1 mg inaktivem TdR/ml fixiert.

2.4.2 Feulgenfärbung

Das entnommene Jejunum-Stück wurde in toto feulgengefärbt. Nach der Fixation wurde das Gewebe in eine absteigende Alkoholreihe überführt, und zwar 10 Minuten in 70%igen Alkohol, 10 Minuten in 50%igen Alkohol, 10 Minuten in 30%igen Alkohol und zum Schluß 5 Minuten in Aqua dest. Daran schloß sich die Hydrolyse der ganzen Jejunum-Stücke in 1 N HCl bei 60° C für 6 Minuten an. Die Unterbrechung der Hydrolyse erfolgte durch kurzes Eintauchen der Organproben in kaltes Aqua dest. Anschließend wurden die Darmstücke für die nächsten 1 - 3 Stunden in Schiff's Reagens (0,5 g Pararosanilin, 70 ml Aqua bidest., 10 ml 1 N HCl, 0,5 g Kalium-Natriumbisulfit) gefärbt und danach zunächst dreimal kurz in Leitungswasser und dann dreimal kurz in Aqua dest. gespült. Da nicht alle Krypten gleichzeitig gequetscht werden konnten, wurde ein Teil der Krypten bei - 18° C in 45%iger Essigsäure eingefroren (SCHMEER, 1971).

2.4.3 Quetschtechnik

Im Gegensatz zu histologischen Schnitten von Krypten, bei denen der ausgezählte Mitoseindex und die gezählte Anzahl der markierten Zellen durch geometrische Faktoren beeinflußt werden und entsprechend korrigiert werden müssen (TANNOK, 1967), bieten die Krypten-Quetschpräparate den Vorteil, alle Zellen einer Krypte zu erfassen. Damit kann der tatsächliche Mitoseindex und Markierungsindex direkt durch Auszählen ermittelt werden.

Vor dem Quetschen der Krypten muß das Gewebe mindestens 30 Minuten lang in 45%iger Essigsäure bei Zimmertemperatur stehen. Hierbei quellen die Kryptenepithelien weit genug auf, um sich gut quetschen zu lassen. Ohne diese Behandlung lassen sich die Krypten nicht gut auseinanderquetschen. Bei zu langem Verbleib des Gewebes in Essigsäure lösen sich bereits einzelne Teile der Krypten auf.

Zur weiteren Verarbeitung bringt man ein ca. 2 - 3 mm großes Stück Jejunum auf einen gut gereinigten Objektträger, auf welchem sich schon ein Tropfen 45%iger Essigsäure befindet. Mit zwei Insekten-Präpariernadeln trennt man die Krypten am Hals von den Zotten ab und bringt mit einer feinen Kapillare eine einzelne Krypte auf einen zweiten Objektträger in einen Tropfen 45%ige Essigsäure. Auf der Unterseite dieses Objektträgers wurde zuvor zur Orientierung mit einem Diamantschreiber ein kleiner Kreis eingeritzt. Die Größe des Essigsäuretropfens innerhalb des Kreises ist für das Gelingen des Quetschens von Bedeutung. Er muß so groß sein, daß später das Deckglas darauf schwimmen kann, da sich andernfalls die Krypte nicht vollständig auseinanderquetschen läßt. Dieser Tropfen darf aber auch nicht zu groß sein, damit die Zellen nicht beim Niederdrücken des Deckglases unter den Rändern wegschwimmen können. Nun wird das Deckglas mit der Präpariernadel fest angedrückt, so daß die Krypte auseinandergequetscht wird, wobei bei geeignetem Druck mit der Nadel die Zellkerne innerhalb des eingeritzten Kreises bleiben. Dabei muß man darauf achten, daß die Zellkerne weit genug auseinander liegen, damit sich die unterschiedlich markierten Zellkerne später im Autoradiogramm nicht überlagern. Das ist besonders wegen der über die Kernfläche hinausreichenden ^{14}C-Spuren wichtig. Auf der anderen Seite dürfen die Kryptenkerne aber auch nicht zu weit verstreut liegen, damit das Auswerten nicht zu langwierig wird. Der Abstand der Zellkerne wird praktisch durch die Größe des Essigsäure-Tropfens und den Druck mit der Präpariernadel reguliert. Außerdem sollte man nicht von der Seite her quetschen, da sonst die Zellkerne deformiert werden.

Anschließend wird der Objektträger mit den Zellen für etwa 15 Minuten auf Trockeneis gelegt. Man entfernt danach das Deckglas mit einer Rasierklinge (Deckglas springt ab) und taucht den Objektträger kurz in Chromalaungelatine (0,5 % Gelatine und 0,05 % Chromalaun in Aqua dest.), um das Abschwimmen der Kryptenzellkerne zu verhindern. Die abgesprengten Deckgläser waren frei von Kernen, wie Kontrollen ergaben. Die Objektträger mit den Zellen werden bei Zimmertemperatur staubfrei luftgetrocknet.

2.5 Herstellung der Doppelschicht-Autoradiogramme

2.5.1 Aufbringen der ersten Emulsionsschicht, Exposition, Fixation und Entwicklung

Die unterschiedliche Markierung der Kryptenzellen wird mit Hilfe der Doppelschicht-Autoradiographie nachgewiesen. Für das Aufbringen der dünnen Schicht wird die Dipping-Methode angewandt. 30 g der Ilford-K_2-Emulsion werden vorsichtig mit einem Glasstab dem Vorratsgefäß entnommen und in ein graduiertes Becherglas gegeben. In einem Wasserbad mit konstanter Temperatur von 43° C wird die Emulsion geschmolzen und dann 15 ml Aqua bidest., das ebenfalls auf 43° C angewärmt ist, zugefügt. Das Ganze wird mit einem Glasstab umgerührt. Das Umrühren muß vorsichtig erfolgen, da heftiges Rühren Luftbläschen verursacht und möglicherweise auch den Nulleffekt erhöht. Wenn die Emulsion gelöst ist, wird sie durch eine doppelte Mullage in eine Küvette filtriert, wobei man wieder das Entstehen von Luftbläschen sorgfältig vermeiden muß. Dann werden die vorgewärmten Objektträger mit den Präparaten nacheinander vorsichtig in die Emulsion getaucht und mit gleichmäßiger Geschwindigkeit wieder herausgezogen. Mit dem mattierten Ende nach oben werden die Objektträger vertikal in Plastikgestelle zum Abtropfen gestellt und bei völliger Dunkelheit getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Objektträger in lichtdichte schwarze Kunststoffkästchen gebracht, die ein Röhrchen des Trockenmittels "Drierite" ($CaSO_4$) enthalten, mit schwarzem Tesafilm zugeklebt und im Kühlschrank bei 4° C drei Tage lang exponiert.

Entwickelt wird die dünne Emulsionsschicht unter gleichmäßigen automatischen Schüttelbewegungen 4 Minuten lang bei + 18° C in einem frisch angesetzten und filtrierten Amidolentwickler (1,35 g Amidol p.a., Merk 3019 2,4 Diamin-1-phenoldihydrochloriamin, crist., 5,4 g Na_2SO_3 p.a. wasserfrei, 2,4 ml KBr 10 % und 300 ml Aqua dest.). Anschließend werden die Objektträger 10 Minuten lang in 30%iger Natriumthiosulfatlösung unter leichtem Schaukeln fixiert, 20 Minuten fließend gewässert, kurz in Aqua dest. abgespült und getrocknet. Auf diese Weise erhält man nach dem Trocknen eine Emulsionsschicht von ca. 1 µm Dicke.

2.5.2 Aufbringen der inerten Zwischenschicht

Um beide Emulsionsschichten gut zu trennen, wird auf die erste Emulsionsschicht eine inerte Zwischenschicht aufgebracht. Diese muß an beiden Schichten gut haften und außerdem den Verarbeitungsprozeß der dicken Schicht schadlos überstehen. In früheren Versuchen hat sich für diesen Zweck eine Gelatineschicht bestens bewährt. Die Dicke dieser Zwischenschicht muß der maximalen Reichweite der ^{3}H-Beta-Teilchen entsprechen (0,5 mg/cm^2 ≙ 5 µm H_2O), so daß selbst ^{3}H-Beta-Teilchen mit der maximalen Reichweite nicht in die zweite Emulsionsschicht gelangen können.

Für diese Zwischenschicht werden 10 g Gelatine in 100 ml Aqua bidest. steril bei 42° C im Wasserbad gelöst, in eine Küvette gefüllt und in einem anderen Wasserbad auf 30° C heruntergekühlt. Nachdem sich alle Luftblasen aufgelöst haben, werden die mit der dünnen entwickelten Emulsionsschicht beschichteten trockenen Objektträger in die 30° C warme Gelatine getaucht, langsam herausgezogen und für 10 Stunden vertikal stehend getrocknet. Anschließend werden sie in einer filtrierten Formaldehydlösung (1 Teil Formaldehyd, 4 Teile Leitungswasser) 20 Minuten lang gehärtet. Danach werden sie 10 Minuten lang sehr vorsichtig, fließend gewässert, zweimal in Aqua bidest. gespült und getrocknet. Auf diese Weise entsteht eine nach dem Trocknen ca. 5 µm dicke inerte Gelatine-Zwischenschicht.

2.5.3 Aufbringen der zweiten Emulsionsschicht, Exposition, Entwicklung und Fixation

Die Objektträger mit der entwickelten ersten Filmschicht und der völlig trockenen Gelatine-Zwischenschicht werden auf eine PVC-Platte gelegt, auf welcher etwa 6 Objektträger Platz haben. Der erste Objektträger in der Reihe ist ein Leerobjektträger ohne Präparat. Rechts und links werden die Objektträger mit einem weißen Leinenband festgehalten, das mit Leukoplast an der Unterseite der PVC-Platte befestigt ist. Die Emulsion wird unverdünnt bei 42° - 44° C geschmolzen und anschließend durch eine doppelte Mullage in ein Becherglas filtriert. Dabei muß man aus den genannten Gründen ebenso vorsichtig vorgehen wie oben beschrieben. Eine entsprechende Menge der geschmolzenen Emulsion wird nun an einem Glasstab entlang auf den leeren Objektträger gegossen und mit einem sorgfältig gereinigten Glasstab in einem breiten Streifen über die hintereinander liegenden Objektträger verteilt. Dabei darf aber kein großer Druck auf die Unterlage (Objektträger) ausgeübt werden, weil das zu unterschiedlicher Schichtdicke und erhöhtem Nulleffekt in der entwickelten Emulsion führen kann.

Nach einer Wartezeit von 2 Minuten löst man die Befestigungsbänder ab und legt die losen, mit Emulsion beschichteten Objektträger waagerecht über 2 Holzstäbchen, die auf eine Glasplatte aufgeklebt wurden. Nach einer Trockenzeit von 4 - 5 Stunden werden die Objektträger in der gleichen Weise wie oben beschrieben in schwarze Kunststoffkästchen verpackt und für 14 Tage im Kühlschrank bei + 4° C exponiert.

Die Entwicklung der dicken Schicht unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von der oben beschriebenen Entwicklung der dünnen Schicht. Würde die dicke Schicht in gleicher Weise entwickelt wie die dünne Schicht, dann käme es zu einer Überentwicklung der oberen Anteile der dicken Schicht, während die unteren Anteile gegebenenfalls überhaupt nicht entwickelt wären, weil der Entwickler die dicke Schicht nur langsam penetriert. Deshalb wird über längere Zeit (20 Minuten) bei tieferer Temperatur von 12° C und mit einem verdünnten Amidol-Entwickler (4,5 g wasserfreies Natriumsulfit,

1,125 g Amidol, 8,75 g Borsäure, 2,0 ml 10%iges KBr und 500 ml Aqua dest.) unter gleichmäßigem Schütteln entwikkelt. Diese Art der Entwicklung sichert erfahrungsgemäß eine gleichmäßige Entwicklung der gesamten dicken Emulsionsschicht. Nach der Entwicklung werden die Objektträger mit dem Film kurz in Wasser gespült und anschließend 50 Minuten lang unter leichtem Schaukeln in 30%iger Natriumthiosulfatlösung fixiert und danach mindestens 90 Minuten lang fließend gewässert, in Aqua dest. nachgespült und getrocknet. Damit ist die Herstellung der zweiten Emulsionsschicht, deren Schichtdicke nach der Entwicklung im trockenen Zustand ca. 20 - 30 µm beträgt, abgeschlossen. Zur Auswertung werden die Objektträger mit Entellan eingedeckt.

3. AUSWERTUNG DER AUTORADIOGRAMME

3.1 Nulleffekt

Selbst bei noch so sorgfältiger Behandlung der Emulsion während der Herstellung der Doppelschicht-Autoradiogramme läßt sich ein gewisser Nulleffekt nicht vermeiden. Unter dem Nulleffekt versteht man in der Autoradiographie Silberkörner, die nicht durch die Radioaktivität in den Kernen der Kryptenzellen, sondern durch Wärme, Licht, mechanischen Druck, Umgebungsstrahlung und die Anwesenheit bestimmter chemischer Substanzen entstanden sind. Zum Teil ist dieser Nulleffekt unvermeidbar. Schon bei der Herstellung der Emulsion wird durch das immer vorhandene ^{14}C in der Gelatine ein gewisser Nulleffekt erzeugt. Auf der anderen Seite kann der Nulleffekt auch durch unsachgemäße Lagerung oder Handhabung der Emulsion erhöht werden.

Bestimmung des Nulleffektes: Um den Nulleffekt von einer schwachen ^{3}H-Markierung mit nur wenigen Silberkörnern abzugrenzen, wurden je 2 Krypten-Quetschpräparate von Tieren, die nur ^{3}H-TdR erhalten hatten, hinsichtlich der markierten Kerne und der Anzahl der Silberkörner pro Kern ausgewertet. Dabei wurde die Verteilung der Silberkörner über allen Kernen ermittelt. Das ergab eine Verteilungskurve, die mit einer relativ hohen Anzahl von Kernen mit 0 Silberkörnern beginnt, ein Minimum bei 5 Silberkörnern hat, anschließend fast identisch mit der x-Achse verläuft und erst wieder bei Werten von mehr als 40 Silberkörnern ein Maximum erreicht. Aus der Form dieser Silberkornverteilungskurve (Abb. 1) ergibt sich, daß Kerne mit einer Anzahl von 5 Silberkörnern und mehr als ^{3}H-markiert gezählt werden müssen. Die mittlere Silberkornzahl pro markiertem Kern beträgt 40 - 50 Silberkörner.

3.2 Bestimmung der Zählgrenzen

Ein spezielles Problem der Doppelschicht-Autoradiographie sind die durch ^{14}C-TdR in der ersten Schicht produzier-

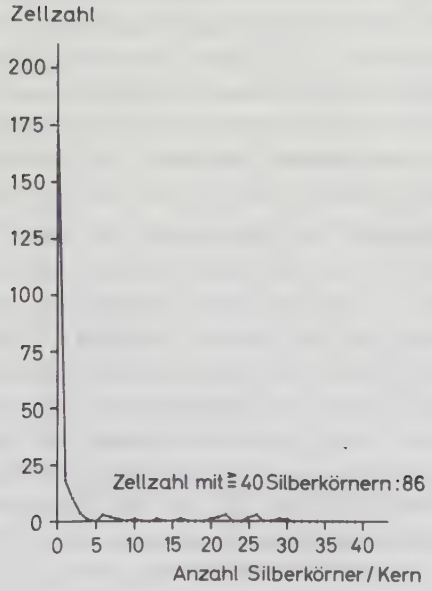

Abb. 1: Häufigkeitsverteilung der Kornzahl pro Kern 90 Minuten nach Gabe von 4 µCi 3-H-TdR/g Körpergewicht

Alle Kerne mit 5 und mehr Silberkörnern können als markiert gezählt werden.
22 Kerne haben zwischen 6 und 39 Silberkörner
86 Kerne haben mehr als 40 Silberkörner

ten sogenannten "falschen" Silberkörner. Während der Exposition der ersten Schicht wird die Emulsion auch von den von den doppelt- und rein-^{14}C-markierten Kernen ausgehenden ^{14}C-Beta-Teilchen getroffen. Um diese falschen Silberkörner gering zu halten, sollte die Expositionszeit der ersten Schicht möglichst kurz sein. Aus diesem Grund ist es wichtig, das Aktivitätsverhältnis ^{3}H/^{14}C so groß wie möglich zu wählen. In unserem Fall betrug dieses Verhältnis 50:1. Das führt zu einer kurzen Belichtungszeit der ersten Schicht und damit zu einer nur geringen Anzahl falscher, d. h. auf der ^{14}C-Markierung beruhender Silberkörner in der ersten Schicht.

Zur Bestimmung der Zählgrenze für eine ^{3}H-Markierung des Zellkernes, d. h. zur Festsetzung, von welcher Kornzahl pro Kern in der ersten Schicht an ein Kern als ^{3}H-markiert zu bewerten ist, muß die Anzahl falscher Silberkörner, welche in der ersten Schicht der Doppelschicht-Autoradiogramm durch die ^{14}C-Beta-Teilchen entstanden sind, festgestellt werden. Zu diesem Zweck wurden Autoradiogramme derjenigen Tiere ausgewertet, welche nur ^{14}C-TdR erhalten hatten, und zwar die gleiche ^{14}C-TdR-Aktivität wie bei den Hauptversuchen. Auf diesen Autoradiogrammen wurde ebenfalls die Verteilung der Silberkörner pro Kern in der ersten Schicht über allen Kernen ermittelt (Abb. 2). Hierbei wurde über ^{14}C-markierten Kernen eine durchschnittliche Anzahl von 5 - 10 Silberkörnern in der ersten Schicht und zwischen 4 und 8 Spuren (bestehend aus mindestens 4 - 5 Körnern in einer Folge) in der zweiten Schicht gefunden. Es zeigte sich jedoch, daß bis zu maximal 20 Silberkörnern pro Kern in der ersten Schicht vorkamen, und deshalb wurde die ^{3}H-Zählgrenze auf 20 Silberkörner pro Kern festgesetzt. Alle Kerne, welche in der ersten Schicht mehr als 20 Silberkörner aufwiesen, wurden als ^{3}H-markiert gewertet. Durch diese hohe Zählgrenze wurde der Anteil der ^{3}H-markierten Kerne, welcher weniger als 20 Silberkörner aufwies, in der Auswertung nicht berücksichtigt. Dieser Anteil war allerdings, wie aus der Silberkornverteilungskurve der ^{3}H-Markierung (Abb. 1) hervorging, vernachlässigbar gering.

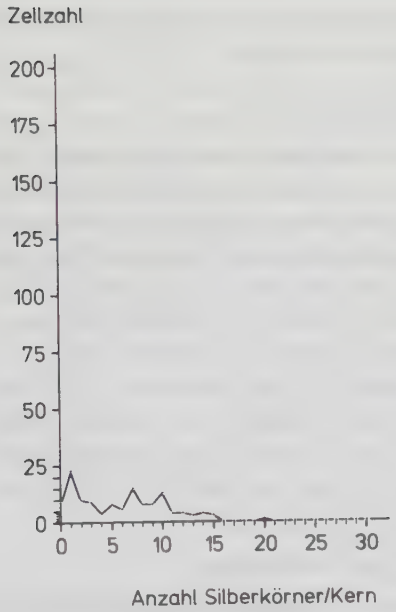

Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der Kornzahl pro Kern in der 1. Emulsionsschicht (sog. "falsche" Silberkörner) nach Gabe von 0,08 µCi 14-C-TdR/g Körpergewicht

Wie die Häufigkeitsverteilung zeigt, können bis zu 20 Silberkörner pro Kern in der 1. Emulsionsschicht durch die ^{14}C-Markierung hervorgerufen werden. Kerne mit mehr als 20 Silberkörnern werden als doppelt markiert gezählt.

Um eine ^{14}C-Markierung vom Nulleffekt abzugrenzen, wurden nur Kerne als ^{14}C-markiert gezählt, bei denen entweder ein Silberkorn in der ersten Schicht und eine damit in Verbindung stehende Spur in der zweiten Schicht oder zwei Spuren in der zweiten Schicht ohne Silberkorn in der ersten Schicht nachweisbar waren.

3.3 Markierungsindex

Der Markierungsindex der Kryptenepithelzellen wurde für je 10 Krypten von jedem Versuchstier ausgewertet, und es wurde unter Berücksichtigung der oben genannten Zählgrenzen die Anzahl der unterschiedlich markierten Zellkerne festgestellt. Kerne, welche nur die Merkmale einer ^{3}H-Markierung aufwiesen, wurden als rein ^{3}H-markierte Kerne gewertet. Zellkerne, welche nur die Anzeichen einer ^{14}C-Markierung trugen, wurden als rein ^{14}C-markiert gezählt. Zellkerne mit den Zeichen beider Markierungen gehörten zur Gruppe der doppelt markierten Kerne. Und Zellkerne, welche in der ersten Schicht weniger als 20 Silberkörner und in der zweiten Schicht keine deutliche Spur aufwiesen, galten als unmarkiert.

Mit Hilfe der Beziehung

$$\text{Markierungsindex} = \frac{\text{Anzahl d. } ^{3}\text{H-mark. Z. mit od. ohne } ^{14}\text{C}}{\text{Gesamtzellzahl der Krypte}} \times 100$$

$$\text{bzw.} = \frac{\text{Anzahl d. } ^{14}\text{C-mark. Z. mit od. ohne } ^{3}\text{H}}{\text{Gesamtzellzahl der Krypte}} \times 100$$

wurden die verschiedenen Markierungsindices als Funktion der Tageszeit bestimmt.

3.4 Mitoseindex

Der Mitoseindex wurde aus der Anzahl der Mitosen pro Krypte $\left(= \frac{\text{Anzahl der Mitosen}}{\text{Gesamtzellzahl der Krypte}} \times 100\right)$ berechnet.

Als Mitosen wurden frühe Prophasen bis frühe Telophasen gewertet. Dabei wurde unterschieden zwischen markierten und unmarkierten Mitosen. Die mittlere G_2-Phasen- und Mitosedauer beträgt bei den Kryptenepithelien der Maus ca. 90 Minuten; zwischen den Zeitpunkten der ^{3}H-TdR-Injektion und der Tötung der Tiere liegen ebenfalls 90 Minuten, d. h. ^{3}H-markierte Zellen können bereits das Ende der Mitose erreicht haben.

3.5 Bestimmung der Zellflußrate in und aus der S-Phase mit Hilfe des Prozentsatzes rein 3-H- und rein ^{14}-C-markierter Zellen nach Doppelmarkierung mit 3-H- und ^{14}-C-Thymidin

Die Zahl der rein ^{3}H-markierten bzw. die Zahl der rein ^{14}C-markierten Zellen gibt die Anzahl von Zellen in einem 1-Stunden-Intervall des Zyklus in G_2 bzw. am Anfang der S-Phase wieder. Das bedeutet, die Zahl der rein ^{3}H- bzw. der rein ^{14}C-markierten Zellen stellen die Flußrate (Zahl der Zellen pro Stunde) in der G_2-Phase bzw. am Anfang von S dar. Zur Bestimmung der Zellflußrate in und aus der S-Phase wurde daher der Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen bzw. rein ^{14}C-markierter Zellen, bezogen auf alle Zellen der Krypte, gebildet.

4. ANWENDUNG DER DOPPELMARKIERUNGSMETHODE MIT ^{3}H- UND ^{14}C-THYMIDIN ZUM NACHWEIS TAGESZEITLICHER SCHWANKUNGEN DER PROLIFERATION DER KRYPTENEPITHELIEN

4.1 Anwendung der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin

Circadiane Schwankungen des Mitose- und Markierungsindex können auf einer Verlängerung oder eine Verkürzung der Phasenlängen beruhen, oder aber auf einem von der Tageszeit abhängigen unterschiedlichen Fluß in und aus den entsprechenden Zyklusphasen.

Mit Hilfe der Doppelmarkierung ist es möglich, Zellen fest definierten Abschnitten des Zellzyklus zuzuordnen und in ihrem Fluß durch den Zyklus in Abhängigkeit von der Tageszeit zu beobachten. In Kap. 4.2 wird ausführlich dargestellt, wie mit Hilfe der Doppelmarkierung eine 1-Stunden-breite Subpopulation rein ^{3}H-markierter Zellen, die den Fluß aus der S-Phase zeigt, und eine ebenfalls 1-Stunden-breite Subpopulation rein ^{14}C-markierter Zellen, die den Fluß in die S-Phase zeigt, erzeugt wird.

Unter steady-state Bedingungen, die für die Krypte vorliegen (SCHULTZE et al. 1972, BURHOLT et al. 1976), ist der Fluß in die S-Phase gleich dem Fluß aus der S-Phase, d. h. der Quotient

$$\frac{\%\text{ rein }^{3}H\text{-markierte Zellen}}{\%\text{ rein }14\text{-C-markierte Zellen}} = 1.$$

Sollten tageszeitliche Schwankungen vorliegen, würde der Quotient größer oder kleiner 1 sein, d. h. je nach Tageszeit von 1 abweichen.

4.2 Prinzip der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Thymidin

Wie die schematische Darstellung in Abb. 3 zeigt, erhalten zum Zeitpunkt Null die Versuchstiere eine erste Injektion von ^{3}H-TdR und eine Stunde später eine zweite Injektion von ^{14}C-TdR. Mit der 1. Injektion von ^{3}H-TdR werden alle Zellen,

die sich zum Zeitpunkt der Injektion in der S-Phase befinden, ^{3}H-markiert. In dem Zeitintervall zwischen den beiden Injektionen verläßt eine 1-Stunden-breite Subpopulation der ^{3}H-markierten Zellen die S-Phase und tritt in die G_2-Phase über. Auf der anderen Seite treten in diesem Zeitintervall zwischen den beiden Injektionen unmarkierte Zellen aus der G_1-Phase neu in die S-Phase ein. Mit der 2. ^{14}C-TdR-Injektion werden alle Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befinden, ^{14}C-markiert. Mit Hilfe dieser Doppelmarkierung entstehen also drei unterschiedlich markierte Zellpopulationen: Eine 1-Stunden-breite rein ^{3}H-markierte Zellpopulation in der G_2-Phase; das sind die Zellen, die die S-Phase zwischen den Injektionen verlassen haben; eine 1-Stunden-breite Subpopulation rein ^{14}C-markierter Zellen am Anfang der S-Phase; das sind die Zellen, die zwischen beiden Injektionen neu in die S-Phase eingetreten sind. Außerdem entstehen doppelt markierte Zellen; das sind jene Zellen, die sich sowohl zum Zeitpunkt der ^{3}H-TdR- als auch zum Zeitpunkt der ^{14}C-TdR-Injektion in der S-Phase befanden. Alle drei unterschiedlich markierten Zellpopulationen können auf Doppelschicht-Autoradiogrammen quantitativ unterschieden werden.

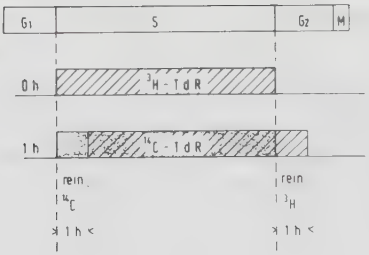

Abb. 3: Schema der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR

Zeitpunkt 0 h: 1. Injektion von 4 µCi ^{3}H-TdR/g Körpergewicht

Zeitpunkt 1 h: 2. Injektion von 0,08 µCi ^{14}C-TdR/g Körpergewicht

Zeitpunkt 1,5 h: Tötung der Tiere

1-Stunden-breite Subpopulation rein ^{3}H-markierter Zellen in der G_2-Phase

1-Stunden-breite Subpopulation rein ^{14}C-markierter Zellen am Anfang der S-Phase.

5. ERGEBNISSE

5.1 Graphische Darstellung der verschiedenen gemessenen Parameter

Für jeden Zeitpunkt im Tagesverlauf (9.00 Uhr, 12.00 Uhr, 15.00 Uhr etc.) wurden von 2 - 4 Tieren je 10 Krypten ausgewertet. Dabei wurde der Mitoseindex, der ^{3}H- und ^{14}C-Markierungsindex (s. o.) und der Prozentsatz der rein ^{3}H- und rein ^{14}C-markierten Zellen, bezogen auf alle Zellen der Krypten, in den 10 Krypten pro Tier ermittelt. Aus den so erhaltenen Werten wurden pro Zeitpunkt der Mittelwert $\pm$ Standardfehler für jeden Parameter aus 2 - 4 Tieren berechnet (Tabelle 1). In den Figuren der Abb. 5 - 9 wurden diese Mittelwerte aufgetragen. Anstelle des Standardfehlers wurde jedoch das 90%-Konfidenzintervall des jeweiligen Mittelwertes eingezeichnet, wie unten noch näher begründet wird. Diese Mittelwerte und das 90%-Konfidenzintervall wurden in Abhängigkeit von der Tageszeit aufgetragen (Abb. 5 - 9).

Zusätzlich wurde der Quotient $\frac{\%\ \text{rein}\ ^{3}H\text{-mark. Zellen}}{\%\ \text{rein}\ ^{14}C\text{-mark. Zellen}}$ pro Tier gebildet. Der Mittelwert dieses Quotienten sowie das 90%-Konfidenzintervall der pro Zeitpunkt untersuchten Tiere wurde ebenfalls als Funktion der Tageszeit aufgetragen (Abb. 10).

5.2 Gesamtzellzahl

Abb. 4 zeigt den Verlauf der Mittelwerte der Gesamtzellzahl pro Krypte für jedes einzelne Versuchstier. Zu Beginn der Untersuchung, um 9.00 Uhr morgens, liegt der Mittelwert aus 2 - 4 Tieren bei 359 Zellen pro Krypte. Dieser Wert fällt bis 24.00 Uhr kontinuierlich ab bis auf 235 Zellen pro Krypte und steigt danach ebenso gleichmäßig auf 280 Zellen pro Krypte um 9.00 Uhr des nächsten Versuchstages wieder an. Die 9.00-Uhr-Werte entsprechen sich im Bereich der Fehlergrenze.

5.3 Mitoseindex

Wie Abb. 5 zeigt, liegt der mittlere Mitoseindex zu Beginn der Untersuchungen um 9.00 Uhr des ersten Versuchstages bei 1,1 %, erreicht bis 12.00 Uhr einen ersten Maximalwert von 2,1 %, fällt dann bis 18.00 Uhr auf ein Minimum von 0,9 % ab, steigt bis 3.00 Uhr langsam auf ein zweites Maximum von 1,8 % an und sinkt danach bis 9.00 Uhr des zweiten Versuchstages wieder auf 1,3 % ab. Auch hier entspricht der 9.00-Uhr-Wert des 1. Tages demjenigen des 2. Tages innerhalb der Fehlergrenze.

5.4 ^{3}H-Markierungsindex

Der ^{3}H-Markierungsindex in Abb. 6 beträgt zu Versuchsbeginn im Mittel 37,7 %, steigt bis 12.00 Uhr auf 40,5 % an und fällt dann bis 15.00 Uhr auf 35,9 % ab. Um 18.00 Uhr liegt er bereits wieder bei 38,2 %, erreicht mit 41,1 % um 21.00 Uhr seinen höchsten Wert und fällt bis 3.00 Uhr nur geringfügig ab (38,9 %). Um 9.00 Uhr des zweiten Versuchstages beträgt der ^{3}H-Markierungsindex 34,0 %.

5.5 ^{14}C-Markierungsindex

In Abb. 7 ist der Verlauf des ^{14}C-Markierungsindex dargestellt. Um 9.00 Uhr des ersten Versuchstages beträgt er 39,2 %, fällt bis 15.00 Uhr auf 35,5 %, steigt dann bis 18.00 Uhr auf 40,4 % an, hält diesen Wert fast konstant bis 24.00 Uhr. Bis 9.00 Uhr des zweiten Versuchstages fällt der ^{14}C-Markierungsindex wieder auf 34,9 % ab.

5.6 Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen

Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, zeigt der Verlauf des Prozentsatzes rein ^{3}H-markierter Zellen keine großen Schwankungen. Zu Beginn der Untersuchungen beträgt er 5,6 %, steigt bis 12.00 Uhr auf 6,8 % an, behält diesen Wert fast bis 15.00 Uhr mit 6,7 % konstant bei und fällt danach vorübergehend bis auf 4,6 % um 18.00 Uhr ab. Auch im weiteren Verlauf der Kurve treten nur unbedeutende Schwankungen auf: 21.00 Uhr 5,8 %, 24.00 Uhr 4,9 %, 3.00 Uhr 6,7 % und 9.00 Uhr des nächsten Tages 4,4 %.

5.7 Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen

Abb. 9 läßt ein ähnliches Verhalten, d. h. keine grossen Schwankungen für den Verlauf des Prozentsatzes rein ^{14}C-markierter Zellen erkennen: 9.00 Uhr des ersten Versuchstages 7,1 %, 12.00 Uhr 5,0 %, 15.00 Uhr 6,4 %, 18.00 Uhr 6,8 %, 24.00 Uhr 4,3 %, 3.00 Uhr 4,3 %, 6.00 Uhr 5,5 % und 9.00 Uhr des zweiten Versuchstages 5,3 %.

5.8 Quotient $\frac{\text{\% rein } ^3\text{H-mark. Zellen}}{\text{\% rein } ^{14}\text{C-mark. Zellen}}$

Wie aus Abb. 10 hervorgeht, beträgt der Quotient $\frac{\text{\% rein 3-H-mark. Zellen}}{\text{\% rein } ^{14}\text{C-mark. Zellen}}$ am ersten Untersuchungszeitpunkt im Mittel 0,9, erreicht um 12.00 Uhr ein erstes Maximum von 1,4, fällt bis 18.00 Uhr auf 0,7 ab und steigt dann zu einem zweiten Maximum von 1,6 um 3.00 Uhr an. Danach fällt er bis 9.00 Uhr des zweiten Versuchstages wieder auf 0,9 ab.

5.9 Statistik

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits ausführlich dargestellt, wurden von 9.00 Uhr an in 3-stündigen Intervallen bei den Versuchstieren pro Untersuchungszeitpunkt folgende zellkinetische Parameter bestimmt:

- Gesamtzellzahl pro Krypte
- Mitoseindex
- ^{3}H-Markierungsindex
- ^{14}C-Markierungsindex
- Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen
- Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen
- Quotient $\frac{\text{\% rein 3-H-mark. Zellen}}{\text{\% rein } ^{14}\text{C-mark. Zellen}}$

Zur Ermittlung des Meßfehlers der einzelnen Parameter wurde einmal der statistische Fehler berechnet, d. h. pro Zeitpunkt wurde der Gesamtmittelwert ± Standardfehler aus den Einzelwerten aller Tiere eines Zeitpunktes gebildet. Auf der anderen Seite wurde pro Zeitpunkt der Mittelwert ± Standardfehler aus den Mittelwerten der Tiere berechnet. Der statistische Fehler für die gemessenen Parameter ist mit Ausnahme des Mitoseindex gegenüber dem Fehler, der auf

Schwankungen von Tier zu Tier beruht, vernachlässigbar gering und wurde deshalb bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt. Lediglich der Mitoseindex bildet eine Ausnahme. Hier ist wegen der kleinen Zahl der Mitosen der statistische Fehler größer als die Schwankung von Tier zu Tier. Bei der Beurteilung der Fehlergrenze der Werte für den Mitoseindex muß das berücksichtigt werden.

Da auch die Zahl der Tiere pro Zeitpunkt unterschiedlich ist, ist die Angabe des Standardfehlers, berechnet aus den Mittelwerten der Tiere, problematisch. Für den Zeitpunkt 3.00 Uhr waren die Präparate von nur 2 Tieren auswertbar. Da die Werte dieser 2 Tiere zufällig gut übereinstimmten, würde die Angabe des Fehlers, der nur die Schwankungen von Tier zu Tier wiedergibt, täuschen. Aus diesem Grund wurde das 90%-Konfidenzintervall der Werte in den einzelnen Kurven eingetragen. Bei der Berechnung des 90%-Konfidenzintervalls wird von den Einzelwerten der Tiere pro Zeitpunkt ausgegangen und neben der Schwankung von Tier zu Tier wird auch die Zahl der Tiere berücksichtigt. Mit einer 90%igen Wahrscheinlichkeit liegt der wahre Mittelwert im Bereich des eingezeichneten Intervalls.

Auf die Daten wurde eine einfache Varianzanalyse angewandt, d. h. es wurde getestet, ob sich ein Gruppenmittelwert eines bestimmten Parameters von mindestens einem anderen Gruppenmittelwert im Verlauf der Tageszeit statistisch unterscheidet.

Liegen keine tageszeitlichen Schwankungen der gemessenen Parameter vor, so sollten die Werte über den Tagesverlauf konstant sein. Die Nullhypothese: "Die Parameter zu den verschiedenen Zeitpunkten unterscheiden sich nicht" wird mit der Irrtumswahrscheinlichkeit α zurückgewiesen, wenn die berechnete Testgröße $\hat{F} = \frac{\text{Varianz zwischen den Gruppen}}{\text{Varianz innerhalb der Gruppen}}$ die entsprechende Schranke F der Fisher-Verteilung (s. Tabelle 2) überschreitet. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde 5 % gewählt.

Da es sich bei den Daten um Prozentwerte handelt, wurde vor Berechnung der Testgröße eine arcsin ($\sqrt{\ }$)-Transformation durchgeführt, um die Voraussetzungen des Testes zu erfüllen. Die ausgerechneten Werte zeigt die Tabelle 2. Bei der Interpretation ist zu beachten, daß die Parameter teilweise voneinander abhängig sind.

Für den Parameter $\frac{\%\text{ rein }^{3}\text{H-mark. Zellen}}{\%\text{ rein }^{14}\text{C-mark. Zellen}}$ kann die Nullhypothese:
"Das Verhältnis $\frac{\%\text{ rein }^{3}\text{H-mark. Zellen}}{\%\text{ rein }^{14}\text{C-mark. Zellen}}$ bleibt über 24 Stunden konstant"
auf dem 5 % Niveau zurückgewiesen werden. Auffällig ist noch die Übereinstimmung im Verlauf der beiden Parameter "Mitoseindex" und "Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen". Hier kann man aber wegen der erwähnten Abhängigkeit nicht von Signifikanz sprechen.

5.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Von den gemessenen zellkinetischen Parametern der Jejunumkryptenepithelien der Maus als Funktion der Tageszeit (Gesamtzellzahl pro Krypte, ^{3}H-TdR- und ^{14}C-TdR-Markierungsindex, Mitoseindex, Prozentsatz rein ^{3}H- bzw. rein ^{14}C-markierter Zellen sowie der Quotient davon) kann mit Hilfe der oben genannten Varianzanalyse nur für den Mitoseindex, sowie für den Quotienten $\frac{\%\text{ rein 3-H-mark. Zellen}}{\%\text{ rein }^{14}\text{C-mark. Zellen}}$ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ein Unterschied von einem Gruppenmittelwert zu mindestens einem anderen, im Verlauf der Tageszeit gemessenen festgestellt werden (Tabelle 2). Für den Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen liegt die Testgröße nur knapp über der Testschranke. Auf die gegenseitige Abhängigkeit dieser Parameter wird in der Diskussion näher eingegangen. Die Deutung dieser Ergebnisse im Hinblick auf das Vorliegen von tageszeitlichen Schwankungen wird ebenfalls im Folgenden diskutiert.

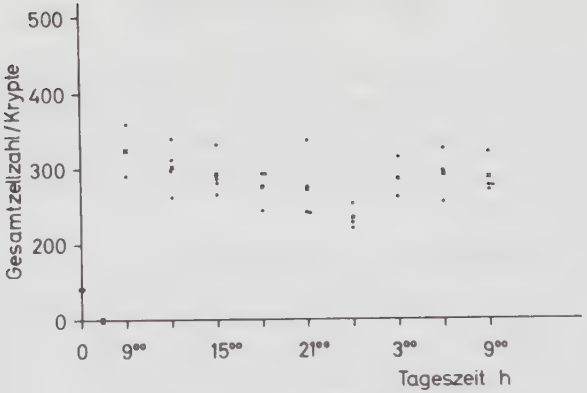

Abb. 4: Gesamtzellzahl der Krypte als Funktion der Tageszeit

Jeder Punkt entspricht der mittleren Zellzahl pro Krypte, ausgezählt an 10 Krypten eines Versuchstieres. Jedes x entspricht dem Gruppenmittelwert.

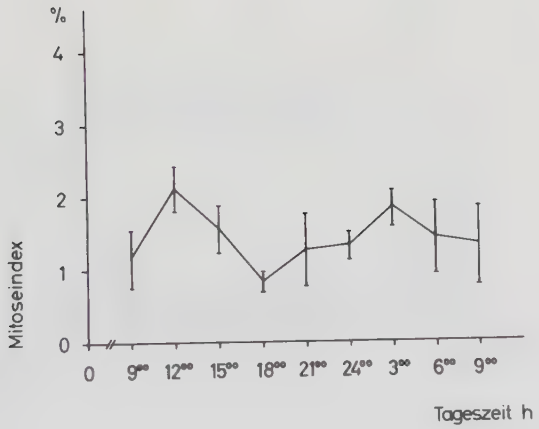

Abb. 5: Mitoseindex als Funktion der Tageszeit

Jeder Punkt entspricht dem mittleren Mitoseindex pro 10 Krypten eines Versuchstieres.

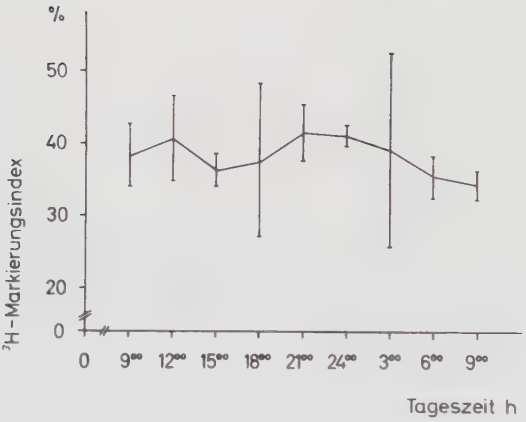

Abb. 6: ^{3}H-Markierungsindex als Funktion der Tageszeit

Jeder Punkt entspricht dem mittleren ^{3}H-Markierungsindex (alle ^{3}H-markierten Kerne mit und ohne ^{14}C, bezogen auf alle Zellen) von 10 Krypten eines Versuchstieres.

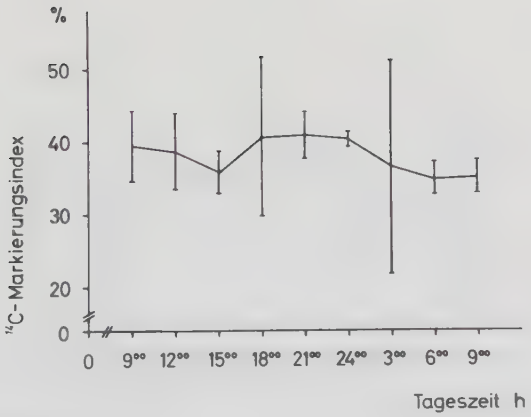

Abb. 7: ^{14}C-Markierungsindex als Funktion der Tageszeit

Jeder Punkt entspricht dem mittleren ^{14}C-Markierungsindex (alle ^{14}C-markierten Kerne mit und ohne ^{3}H, bezogen auf alle Zellen) von 10 Krypten eines Versuchstieres.

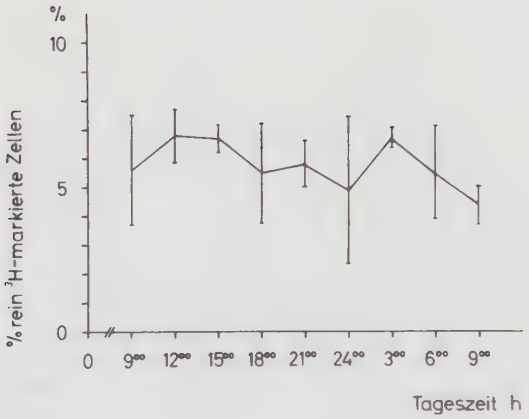

Abb. 8: <u>Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen als Funktion der Tageszeit</u>

Jeder Punkt entspricht dem mittleren Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen pro 10 Krypten eines Versuchstieres.

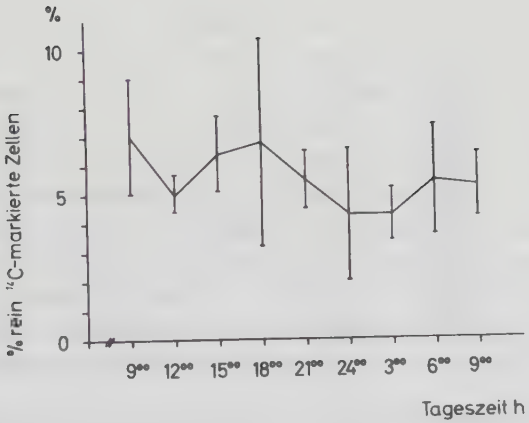

Abb. 9: Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen als Funktion der Tageszeit

Jeder Punkt entspricht dem mittleren Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen pro 10 Krypten eines Versuchstieres.

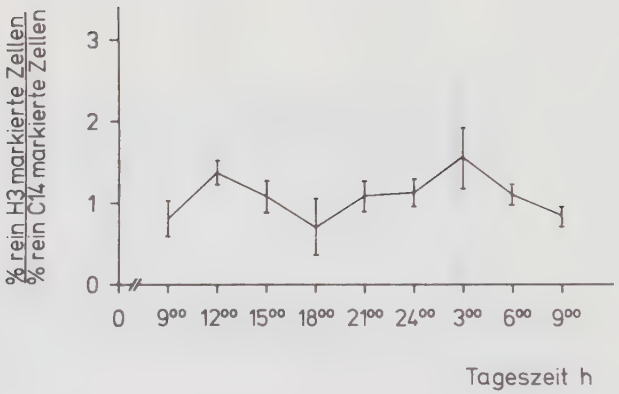

Abb. 10: Quotient $\frac{\text{rein } {}^{3}\text{H-markierte Zellen}}{\text{rein } {}^{14}\text{C-markierte Zellen}}$ als Funktion der Tageszeit

Jeder Punkt gibt den Mittelwert dieses Quotienten pro 10 Krypten eines Versuchstieres wieder.

6. DISKUSSION

Im Gegensatz zu dem üblichen Vorgehen bei der Abfassung einer Arbeit, in der Diskussion zunächst die eigenen Ergebnisse zu besprechen, soll in der vorliegenden Arbeit mit einem Überblick über die zur Frage der tageszeitlichen Schwankungen der Zellproliferation vorliegende Literatur begonnen werden. Das geschieht mit dem Ziel, einmal die Vielzahl der Untersuchungen tageszeitlicher Schwankungen der Zellproliferation darzustellen; zum anderen aber wird dabei deutlich, wie widersprüchlich die Ergebnisse hinsichtlich tageszeitlicher Schwankungen der Proliferationsaktivität im allgemeinen und bezüglich der Kryptenzellen im Dünndarm der Maus im besonderen sind. Diese widersprüchlichen Aussagen über das Vorliegen von tageszeitlichen Schwankungen der Zellproliferation in den Kryptenepithelien des Dünndarms der Maus waren der Anlaß, dieses Problem mit Hilfe der vorliegenden Versuche noch einmal anzugehen. Vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur ist die Diskussion der eigenen Ergebnisse leichter durchzuführen.

6.1 Literaturübersicht zur Untersuchung tageszeitlicher Schwankungen der Zellproliferation

Eine Vielzahl von Autoren haben den Einfluß der Tageszeit auf zellkinetische Parameter - meist Mitose- und Markierungsindex - untersucht und sind dabei zu widersprüchlichen Ergebnissen gekommen.

Die verschiedenen Untersuchungen werden in den folgenden Kapiteln diskutiert; zur Übersicht sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Tabelle 3 zusammengefaßt.

6.1.1 Untersuchungen, die gegen das Vorliegen von tageszeitlichen Schwankungen in der Zellproliferation des Darmepithels sprechen

LEBLOND und STEVENS (1948) beschäftigten sich im Rahmen eines größeren Versuches mit weiblichen Ratten mit dem Problem der circadianen Rhythmik und kamen nach der Ermittlung des Mitoseindex in Ileum und Duodenum um 8.00 Uhr,

16.00 Uhr und 24.00 Uhr zu dem Schluß, daß keine tageszeitlichen Schwankungen des Mitoseindex vorliegen. Dieses Ergebnis ist aber angesichts des 8-Stunden-Untersuchungs-Intervalls und der großen Unterschiede der Mitoseindices zwischen den einzelnen Tieren eines Zeitpunktes kaum geeignet, über das Vorhandensein einer circadianen Rhythmik Auskunft zu geben. Zur statistischen Überprüfung ihrer Ergebnisse äußerten sich die Autoren nicht.

BERTALANFFY (1960) untersuchte u. a. das Zylinderepithel des Darmtraktes von männlichen Albinoratten und ermittelte im 6-Stunden-Abstand mit der stathmokinetischen Methode mit Hilfe von Colchizin das Verhalten des Mitoseindex über den Tagesverlauf. Der Autor wies einen über den ganzen Tag konstanten Verlauf des Mitoseindex im Zylinderepithel des Darmtraktes, so auch im Jejunumkryptenepithel nach. Diese Ergebnisse lassen jedoch keinen Schluß auf das Fehlen tageszeitlicher Schwankungen des Mitoseindex zu: Um das Vorhandensein einer circadianen Rhythmik zu überprüfen, liegen die Untersuchungszeitpunkte im 6-Stunden-Abstand zu weit auseinander. Über eine statistische Überprüfung seiner Ergebnisse machte der Autor keine Angaben.

PILGRIM und MAURER (1963; 1965) konnten bei ihren Arbeiten zur circadianen Rhythmik ebenfalls keine Schwankungen des ^{3}H-Markierungsindex, des Mitoseindex und der Anzahl Silberkörner pro Kern für das Jejunumkryptenepithel der Maus finden. Auch diese Untersuchungen wurden im 6-Stunden-Intervall durchgeführt; Minima und Maxima könnten dabei zufällig nicht erfaßt worden sein. Bemerkenswert ist außerdem, daß bei einer auffälligen Kostanz des Mitoseindex ein Wert, nämlich um 17.30 Uhr, deutlich nach unten abweicht. Das ist insofern interessant, als in der vorliegenden Untersuchung ein Minimum des Mitoseindex um 18.00 Uhr gefunden wurde. Angaben zur statistischen Überprüfung der Ergebnisse wurden nicht gemacht.

6.1.2 Untersuchungen, die für das Vorliegen von tageszeitlichen Schwankungen in der Zellproliferation des Darmepithels sprechen

BULLOUGH (1948) untersuchte die tageszeitlichen Schwankungen in der Zellproliferation der verschiedenen Gewebe männlicher erwachsener Mäuse. Er überprüfte den Mitoseindex verschiedener Gewebe im 2-Stunden-Abstand, u. a. auch den der Duodenalmucosa und fand hierfür ein Maximum des Mitoseindex um 14.00 Uhr und ein Minimum des Mitoseindex um 10.00 Uhr und um 22.00 Uhr. Zusätzlich beobachtete er eine ebenfalls bimodale tageszeitliche Schwankung der Körperaktivität, die sich zur Schwankung des Mitoseindex gegenläufig verhielt, d. h. ein Maximum der Körperaktivität (entspricht der Fütterungszeit) fiel mit einem Minimum des Mitoseindex zusammen und umgekehrt. Daraus schloß er auf eine Beeinflussung des Mitoseindex durch Körperaktivität. BULLOUGH gibt an, in allen Fällen, in denen die Mittelwerte eine hohe Standardabweichung zeigten, die statistische Signifikanz der Ergebnisse nachgeprüft zu haben.

SIGDESTAD et al. (1969) untersuchten bei männlichen Mäusen mittleren Lebensalters das Verhalten des Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex des Jejunumkryptenepithels im Tagesverlauf im 3-Stunden-Intervall. Die Autoren stellten für den Verlauf des Mitoseindex ein Maximum um 3.00 Uhr und ein Minimum um 15.00 Uhr fest, und für den ^{3}H-Markierungsindex fanden sie ebenfalls ein Maximum um 3.00 Uhr und ein Minimum um 15.00 Uhr. Außerdem überprüften sie die ^{3}H-TdR-Einbaurate in die Krypte in Abhängigkeit von der Tageszeit. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe des Szintillationszählers die ^{3}H-TdR-Aktivität in jeweils 50 Krypten bestimmt. Die Autoren fanden hierfür ein Maximum zwischen 24.00 und 3.00 Uhr und ein Minimum um 15.00 Uhr. Im Gegensatz dazu war die ^{3}H-TdR-Einbaurate pro markiertem Kern unabhängig von der Tageszeit konstant. Daraus schlossen die Autoren auf einen über den ganzen Tag gleichmäßigen Verlauf der DNA-Syntheserate. Die tageszeitlichen Schwankungen können also nicht auf Schwankungen der DNA-Syntheserate beruhen, sondern müssen

andere Ursachen haben, z. B. unterschiedliche Anzahl der Zellen in der S-Phase. Die Autoren machten keine Angaben zu einer statistischen Überprüfung der Ergebnisse.

Derselbe Versuch (SIGDESTAD und LESHER, 1971) wurde mit entgegengesetztem Hell-Dunkel-Rhythmus (hell: 18.00 - 6.00 Uhr, dunkel: 6.00 - 18.00 Uhr) im Untersuchungsabstand von 6 Stunden wiederholt. Die Umkehr des Hell-Dunkel-Rhythmus führte tatsächlich zu einer Umkehr der tageszeitlichen Schwankung des Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex. Der Mitoseindex wies ein Maximum um 15.00 Uhr und ein Minimum um 3.00 Uhr auf, der ^{3}H-Markierungsindex zeigte ebenfalls ein Maximum um 15.00 Uhr und desgleichen auch ein Minimum um 3.00 Uhr, wie der Mitoseindex. Die ^{3}H-TdR-Einbaurate hatte ihr Maximum ebenfalls um 15.00 Uhr und ihr Minimum um 3.00 Uhr. Auch hier berichten die Autoren nichts über statistische Berechnungen zu den Ergebnissen.

SCHEVING et al. (1972) untersuchten experimentell das Vorliegen einer circadianen Rhythmik der Zellproliferation im Duodenum von Maus und Ratte. Zu diesem Zweck haben die Autoren im 1-Stunden-Abstand den Mitoseindex und die ^{3}H-TdR-Einbaurate mit Hilfe des Szintillationszählers im Duodenum der Ratte gemessen. Sie fanden ein Maximum des Mitoseindex zwischen 12.00 und 15.00 Uhr und ein Minimum zwischen 18.00 und 6.00 Uhr. Die ^{3}H-TdR-Einbaurate zeigte ein Maximum zwischen 8.00 und 18.00 Uhr und ein Minimum zwischen 19.00 und 1.00 Uhr. Darüber hinaus untersuchten SCHEVING et al. den Einfluß von Isoproterenol auf den circadianen Rhythmus des Duodenalepithels der Maus. Dabei bestimmten sie in 4-stündigem Abstand den Mitoseindex nach Isoproterenol-Applikation und verglichen diesen Verlauf des Mitoseindex mit dem der Kontrollmäuse, denen statt Isoproterenol Kochsalz injiziert worden war. Dabei stellten sie für die Kontrollmäuse ein Maximum des Mitoseindex um 9.00 Uhr und ein Minimum des Mitoseindex um 17.00 Uhr fest, während bei den Mäusen mit Isoproterenolinjektion keine Schwankungen mehr festzustellen waren. Je nach Untersuchungszeitpunkt konnte überhaupt

kein Effekt des Isoproterenols auf den Mitoseindex des Duodenumepithels nachgewiesen werden bzw. die bei den Kontrolltieren deutlichen Maxima des Mitoseindex verschwanden. Da Isoproterenol ein β-Sympatikomimetikum und dem Adrenalin ähnlich ist, schließen die Autoren auf einen möglichen Einfluß von Hormonen und Pharmaka auf die Zellproliferation von Duodenalepithel. Alle Ergebnisse wurden statistisch mit Hilfe des "Student-t"-Testes bzw. der Methode nach Halberg et al. (1967) überprüft und der Wert der Signifikanz wurde für die jeweilige Meßgröße angegeben.

Abgesehen von dem Effekt des Isoproterenols ist zu bemerken, daß das Maximum des Mitoseindex der Kontrollmäuse bei 9.00 Uhr gefunden wurde, während dieses Maximum im früheren oben genannten Versuch zwischen 12.00 und 15.00 Uhr lag.

SIGDESTAD und LESHER (1972) untersuchten die Dauer des Zellzyklus und die Dauer der einzelnen Phasen zu den Zeitpunkten der in den oben genannten früheren Versuchen gemessenen Maxima von Mitoseindex, ^{3}H-Markierungsindex und ^{3}H-TdR-Einbaurate um 3.00 Uhr und der Minima dieser Meßwerte um 15.00 Uhr. Für beide Zeitpunkte erstellten die Autoren nach der Methode von Quastler und Sherman (1959) und Painter und Drew (1959) Percent-Labelled-Mitoses-Kurven, mit deren Hilfe sie die Zellzykluszeiten berechneten. Sie fanden zum Zeitpunkt der Maxima um 3.00 Uhr eine kürzere Generationszeit und eine kürzere G_1-Phase, sowie eine leichte Verlängerung der S-Phase und der Mitosedauer als zum Zeitpunkt der Minima um 15.00 Uhr. Darüber hinaus war der Anteil markierter Zellen pro Krypte sowie die ^{3}H-TdR-Einbaurate um 3.00 Uhr deutlich höher als um 15.00 Uhr. Mit Hilfe dieser Ergebnisse und der Ergebnisse aus früheren oben genannten Versuchen (SIGDESTAD et al., 1969) berechneten die Autoren nach der Hagemann-Formel (Hagemann et al. 1970) die Anzahl der proliferierender Zellen pro Krypte und stellten fest, daß dieser Wert um 3.00 Uhr 40 % höher liegt als um 15.00 Uhr. Über eine statistische Überprüfung der Ergebnisse wurden keine Angaben gemacht.

Diese Untersuchungen zeigen nach Meinung der Autoren eindeutig, daß die Zellproliferation der Kryptenepithelien im Jejunum der untersuchten Maus einer tageszeitlichen Schwankung unterliegt. Diese tageszeitliche Schwankung ist durch einen Wechsel der Hell-Dunkel-Phase umkehrbar. Die Autoren nehmen einen Zusammenhang von Nahrungsaufnahme und Zellproliferation an. Die Nahrungsaufnahme kann aber nicht der entscheidende Regulationsmechanismus sein, da eine Änderung der Fütterungszeiten keine Änderung dieses tageszeitlichen Rhythmus nach sich zog.

Die auch von diesen Autoren gefundenen zeitlichen Übereinstimmungen des Maximums von Mitoseindex und ^{3}H-Markierungsindex führen die Autoren auf einen gemeinsamen Stimulus für Zellen in der G_2- und G_1-Phase zurück. Im Gegensatz zu BULLOUGH (1948) fanden SIGDESTAD und LESHER (1972) das Maximum des Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex jedoch nicht während der Ruhephase der Tiere, sondern während der Wachphase.

AL-DEWACHI et al. (1976) untersuchten den Mitoseindex und ^{3}H-Markierungsindex in den Jejunumkrypten männlicher weißer Ratten im 2-Stunden-Abstand. Diese Autoren fanden statistisch signifikante ($P < 0,01$) tageszeitliche Schwankungen des Mitoseindex und des ^{3}H-Markierungsindex. Ein Maximum des Mitoseindex trat um 15.00 Uhr auf und ein Minimum um 1.00 Uhr. Ein Maximum des ^{3}H-Markierungsindex wurde ebenfalls um 15.00 Uhr gemessen, ein Minimum zwischen 3.00 und 5.00 Uhr. Die zeitliche Übereinstimmung der Maxima von Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex, welche nach der statistischen Berechnung mit 95%iger Wahrscheinlichkeit signifikant sind, erklärten AL-DEWACHI et al. mit einem gemeinsamen Zeitgeber für die Zellen in der G_2- und in der G_1-Phase.

POTTEN et al. (1977) konnten mit einem 3-stündigen Untersuchungsabstand bei Versuchen an weiblichen, jungen Mäusen (Stamm BDF_1; C57B1/6xDBA-2) eine tageszeitliche Schwankung des Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex in verschiedenen Zellarten nachweisen. Für die Dünndarmkrypten stellten

sie ein Maximum des Mitoseindex um 6.00 Uhr und ein Minimum um 18.00 Uhr fest. Der ^{3}H-Markierungsindex zeigte ein Maximum von 24.00 bis 3.00 Uhr und ein Minimum von 9.00 - 15.00 Uhr. Als Erklärung für diese Schwankungen von Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex in den Dünndarmkrypten der Maus diskutieren POTTEN et al. einen Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme, die sie als Stimulus für den lokalen Zeitgeber betrachten. Außerdem beobachteten POTTEN und Mitarbeiter, daß sich die Mehrheit der Dünndarmkryptenzellen alle 12 Stunden teilt. Unter der Voraussetzung, daß alle diese Zellen von dem Zeitgeber beeinfluß werden, müßten tageszeitliche Schwankungen des Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex mit 2 Maxima gefunden werden. Da die Autoren dies nicht beobachtet hatten, entwickelten sie eine 2-Zelltypen-Theorie: Nach ihrer Meinung gibt es in der Dünndarmkrypte einmal sogenannte Stammzellen, welche auf Grund des unbekannten Zeitgebers empfindliche circadiane Schwankungen ihres Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex zeigen. Auf der anderen Seite gibt es davon abgeleitete Zellen, die auf dem Weg zur Differenzierung für diesen Zeitgeber unempfindlich geworden sind und keine circadiane Rhythmik in der Proliferation mehr zeigen. Die beobachteten Schwankungen des Mitose- und des ^{3}H-Markierungsindex beziehen sich nach POTTEN et al. nur auf den kleinen Prozentsatz der Stammzellen, während die Mehrheit der Kryptenzellen über den ganzen Tag ein gleichmäßiges Wachstum zeigt. Nähere Angaben zu einer statistischen Überprüfung der Ergebnisse wurden nicht gemacht.

BURNS et al. (1978) untersuchten den circadianen Rhythmus der Zellproliferation verschiedener Gewebe männlicher, junger BDF_1-Mäuse. Sie bestimmten im Flüssigkeitsszintillationszähler die Einbaurate von ^{3}H-TdR in die DNA in 3-stündigem Abstand. Für das Duodenum fanden sie statistisch signifikant ein Maximum der Einbaurate um 5.00 Uhr und ein Minimum um 14.00 Uhr, d. h. eine tageszeitliche Schwankung der ^{3}H-TdR-Einbaurate. Darüber hinaus überprüften sie den Einfluß des LLC-Tumors auf diese Einbaurate

und fanden so unterschiedliche Ergebnisse, daß eine abschließende Aussage darüber nicht möglich war. Die Autoren überprüften alle Ergebnisse dieses Versuches mit statistischen Berechnungen und gaben den Wert der Signifikanz bei allen Kurvenverläufen und Meßgrößen an.

SAKATA und TAMATE (1978) hielten männliche kastrierte Schafe unter konstanten Fütterungsbedingungen und entnahmen bioptisch 5 Tage lang alle 4 Stunden Pansenepithel. In den Biopsieproben wurden jeweils die Anzahl der Basalzellmitosen zur Gesamtzellzahl in Beziehung gesetzt. Die Autoren fanden tageszeitliche Schwankungen des Mitoseindex mit einem Maximum von 16.00 bis 0.00 Uhr und ein Minimum von 8.00 bis 12.00 Uhr. Eine dreimalige Wiederholung dieser Versuche zu anderen Jahreszeiten führte zu leicht abweichenden Ergebnissen. In einem zweiten Versuch wurde eine andere Fütterungszeit gewählt und an drei aufeinanderfolgenden Tagen 6mal biopsiert. Hierbei wurde für den Mitoseindex ein Maximum von 12.00 Uhr bis 4.00 Uhr und ein Minimum um 8.00 Uhr festgestellt. In beiden Versuchen konnten SAKATA und TAMATE eine Abhängigkeit des Mitoseindex vom Fütterungszeitpunkt feststellen, und zwar mit Auftreten eines Maximums des Mitoseindex ca. 5 Stunden nach der Fütterung und einem Minimum des Mitoseindex ungefähr zum Zeitpunkt der nächsten Fütterung. Einen Einfluß anderer Parameter, z. B. Hormonen, räumen die Autoren durchaus ein. Über eine statistische Überprüfung der Ergebnisse machen sie keine Angaben.

SCHEVING et al. (1978) fanden im Jejunum junger männlicher Mäuse deutliche tageszeitliche Schwankungen des ^{3}H-TdR-Einbaus in die DNA. Eine Messung der ^{3}H-TdR-Einbaurate in die DNA mit Hilfe des Szintillationszählers in 3-stündigem Abstand über den Tagesverlauf zeigte ein Maximum der DNA-Synthese der Jejunumkrypte der Maus um 8.00 Uhr und ein Minimum um 17.00 Uhr. Die Ergebnisse wurden statistisch überprüft und der Wert der Signifikanz für die jeweiligen Meßgrößen angegeben.

6.1.3 Untersuchungen zu tageszeitlichen Schwankungen in der Zellproliferation anderer Gewebe

BULLOUGH (1948) untersuchte in der bereits oben genannten Arbeit die tageszeitlichen Schwankungen des Mitoseindex nicht nur für die Duodenalmucosa, sondern auch für andere Zellarten wie Ohrepidermis (in vivo und postmortal), Rückenepidermis, Epididymis, Oesophagus, Lymphknoten und Testis. Er fand für Ohrepidermis (in vivo und postmortal), Rückenepidermis und Oesophagus jeweils Maxima des Mitoseindex um 14.00 und um 6.00 Uhr, für Epididymis um 14.00 und um 4.00 Uhr. Für Ohrepidermis (in vivo und postmortal), Rückenepidermis und Epididymis bestimmte er jeweils Minima des Mitoseindex um 10.00 und um 20.00 Uhr bzw. 22.00 Uhr. Bei Lymphknoten und Testis fand er einen konstant hohen Mitoseindex mit gelegentlichen Wellen ohne Bezug zur diurnalen Rhythmik.

BERTALANFFY (1960) untersuchte in der ebenfalls bereits oben genannten Arbeit den Mitoseindex für das gesamte Epithel des Verdauungstraktes, d. h. neben dem Darmepithel auch für das Epithel von Lippe, Mund, Zunge, Oesophagus, Magen und Anus. Während er für das Zylinderepithel des Verdauungstraktes einen konstanten Mitoseindex über den gesamten Tagesverlauf feststellte, fand er beim Plattenepithel von Lippe, Mund, Zunge, Oesophagus und Anus eine tageszeitliche Schwankung des Mitoseindex mit einem Maximum am späten Nachmittag und Abend und einem Minimum in den frühen Morgenstunden. Wie bereits erwähnt, liegen die Untersuchungszeitpunkte zu weit auseinander, um das Verhalten des Mitoseindex beurteilen zu können.

PILGRIM und MAURER (1963; 1965) untersuchten den Mitoseindex, den ^{3}H-Markierungsindex sowie die Anzahl Silberkörner pro Kern als Funktion der Tageszeit für eine Vielzahl von Zellarten. Die Autoren fanden für das Plattenepithel von Zunge, Vormagen und Oesophagus, für die Epidermis der Bauchhaut und der Ohrmuschel und die Malpighi'schen Körperchen der Milz tageszeitliche Schwankungen. Sie fanden für alle Gewebe ein Maximum des ^{3}H-TdR-Markierungsindex bei 18.00 bis 19.00 Uhr und ein Minimum bei 11.00 bis 12.00 Uhr. Der

Mitoseindex zeigte ein Maximum bei 6.00 Uhr und ein Minimum zwischen 11.30 und 23.30 Uhr (Ausnahme: Maximum des Mitoseindex der Ohrmuschel bei 18.00 Uhr und Minimum zwischen 23.30 und 11.30 Uhr. Konstanter Verlauf des Mitoseindex bei der Milz. Die mittlere Zahl der Silberkörner pro Kern blieb über den ganzen Tag konstant. Keine tageszeitlichen Schwankungen des Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex wurden beobachtet bei den Tubuluszellen der Niere, bei fetalen Zellarten der Ratte und bei drei verschiedenen Ascites-Tumorzellen und, wie bereits berichtet, beim Jejunumkryptenepithel (s. o.). Jedoch liegen auch hier die Untersuchungsabstände mit 6 Stunden zu weit auseinander. Dabei könnten eventuell vorhandene tageszeitliche Schwankungen der zellkinetischen Parameter der Beobachtung entgangen sein.

POTTEN et al. (1977) untersuchten in dem oben beschriebenen Versuch neben dem Dünndarm noch Rückenhaut und Zunge hinsichtlich des Verlaufs des ^{3}H-Markierungsindex und fanden für Rückenhaut und Zunge jeweils ein Maximum des ^{3}H-Markierungsindex um 3.00 Uhr und ein Minimum zwischen 12.00 und 18.00 Uhr. Somit weisen die Autoren für die untersuchten Gewebe in etwa synchrone tageszeitliche Schwankungen des ^{3}H-Markierungsindex nach.

BURNS et al. (1978) untersuchten in der oben genannten Arbeit das Verhalten der ^{3}H-TdR-Einbaurate über den ganzen Tag außer im Duodenum auch noch in anderen Geweben. Sie fanden für die Milz ein Maximum der ^{3}H-TdR-Einbaurate um 20.00 Uhr und ein Minimum um 8.00 Uhr, für den Thymus ein Maximum der ^{3}H-TdR-Einbaurate um 2.00 Uhr und ein Minimum um 14.00 Uhr, für das Knochenmark ein Maximum der ^{3}H-TdR-Einbaurate um 2.00 Uhr und ein Minimum um 8.00 Uhr und für die Leber einen über den ganzen Tag konstanten Einbau von ^{3}H-TdR in die DNA. Daneben überprüften sie auch den Mitoseindex der Cornea und stellten hier ein Maximum des Mitoseindex um 8.00 Uhr und ein Minimum um 23.00 Uhr fest. Diese tageszeitlichen Schwankungen der ^{3}H-TdR-Einbaurate in den verschiedenen Geweben beruhen auf statistisch signifikanten Messungen.

MÖLLER (1978) untersuchte den Einfluß von verschiedenen Störfaktoren, z. B. Geräusche, unvorsichtige Behandlung der Tiere sowie einer ^{3}H-TdR-Injektion (spezifische Aktivität: 6.0 Ci/mmol, Aktivitätsmenge: 1 µCi/g Körpergewicht) auf den circadianen Verlauf des Mitoseindex des Backentaschenepithels syrischer männlicher junger Hamster. Die Untersuchungen erfolgten im 2-Stunden-Abstand. Die gemessenen Mitoseindices wurden mit einer früheren Untersuchung zur circadianen Rhythmik des Mitoseindex ohne die oben genannten Störfaktoren verglichen. Bei diesen Untersuchungen war ein bimodaler Verlauf des Mitoseindex mit 2 Maxima um 11.00 Uhr und um 16.00 Uhr gefunden worden. Unter dem Einfluß der Störgrößen zeigte sich ein verschieden großer Anstieg des Mitoseindex und eine Änderung von Zeitpunkten und Anzahl der Maxima des Mitoseindex. Leider verzichtete die Autorin darauf, den Begriff "unvorsichtige Behandlung der Tiere" näher zu definieren. Als Lautstärke der verwendete Geräusche wurden 60 und 70 dB angegeben, die in den Tierställen normalerweise nicht vorkommen, so daß ein unbeabsichtigter Einfluß ausgeschlossen werden kann. Der angegebenen Veränderung des Mitoseindex durch ^{3}H-TdR-Injektion, nämlich ein schnellerer und höherer Anstieg des Mitoseindex als in der Kontrollgruppe, stehen die langjährigen Erfahrungen des hiesigen Instituts entgegen, die zeigen, daß bei der angegebenen verwendeten Aktivitätsmenge weder die Höhe noch der Verlauf des Mitoseindex beeinflußt werden kann. Alle Versuchsergebnisse wurden mit Hilfe des "unpaired-t"-Testes statistisch überprüft und der jeweilige Signifikanzwert hinter der Meßgröße angegeben.

MÖLLER und LARSEN (1978) untersuchten am Backentaschenepithel syrischer junger männlicher Hamster mit Hilfe der Impulscytophotometrie den Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen in Abhängigkeit von der Tageszeit. Alle 1,5 Stunden wurden die Zellen des Backentaschenepithels impulscytophotometrisch untersucht und ein Maximum der Zellen in der G_1-Phase um 21.50 Uhr, ein Maximum der Zellen in

der S-Phase um 5.20 Uhr und in der (G_2+M)-Phase um 9.50 Uhr festgestellt. In einem zweiten Versuch überprüften sie im 1-Stunden-Abstand den ^{3}H-Markierungsindex und fanden ähnliche Ergebnisse. Sie beobachteten ein Maximum um 5.00 Uhr und ein Minimum des ^{3}H-Markierungsindex um 18.00 Uhr. Die Untersuchungen ergaben, daß im Gegensatz zum Mitoseindex der Verlauf des ^{3}H-Markierungsindex durch externe Parameter nicht beeinflußt wird. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Computers analysiert, aber nähere Angaben zu statistischen Berechnungen wurden nicht gemacht.

SCHEVING et al. (1978) untersuchten in dem oben genannten Versuch die DNA-Syntheserate mit Hilfe der ^{3}H-TdR-Einbaurate nicht nur im Jejunum, sondern auch in einer Reihe anderer Gewebe. Sie fanden für Oesophagus und Magenfundus ein Maximum der DNA-Syntheserate zwischen 2.00 und 5.00 Uhr und ein Minimum um 17.00 Uhr, für das Duodenum ein Maximum der DNA-Syntheserate zwischen 12.00 und 15.00 Uhr und ein Minimum zwischen 20.00 und 23.00 Uhr, für das Rektum ein Maximum der DNA-Syntheserate zwischen 8.00 und 14.00 Uhr und ein Minimum um 23.00 Uhr, für die Zunge ein Maximum der DNA-Syntheserate um 2.00 Uhr und ein Minimum um 14.00 Uhr, für das Knochenmark ein Maximum der DNA-Syntheserate zwischen 11.00 und 14.00 Uhr und ein Minimum zwischen 20.00 und 23.00 Uhr. Außerdem untersuchten sie den Mitoseindex der Cornea und stellten hierfür ein Maximum zwischen 5.00 und 11.00 Uhr und ein Minimum zwischen 11.00 und 2.00 Uhr fest. Die Autoren wiesen also tageszeitliche Schwankungen der DNA-Syntheserate in verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach.

GRUBE et al. (1970) untersuchten das Vorliegen tageszeitlicher Schwankungen in der Zellproliferation der Rükkenepidermis junger weiblicher haarloser Mäuse (Stamm: HR-Anl, Anl. 66) erstmals mit Hilfe der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR und der Colcemid-Technik. In diesen Doppelmarkierungsversuchen bestimmten die Autoren nicht nur den Prozentsatz rein ^{3}H-, rein ^{14}C- und doppelmarkier-

ter Zellen im 2 - 3-Stunden-Abstand über den Tagesverlauf, sondern auch den Markierungs- und Mitoseindex. Darüber hinaus haben sie den Markierungsindex auf mit Einfachmarkierung mit ^{3}H-TdR bzw. ^{14}C-TdR als Funktion der Tageszeit gemessen. Zusätzlich berechneten sie die Anzahl der Zellen in der DNA-Synthese-Phase und in der Mitose aus den Prozentsätzen der rein ^{3}H- bzw. rein ^{14}C-markierten Zellen und verglichen diese Ergebnisse mit den experimentell erhaltenen. Sie fanden ein Maximum des Markierungsindex um 4.00 Uhr in dem ersten mittels Einfachmarkierung durchgeführten Versuch und zwischen 23.00 und 7.00 Uhr in dem zweiten, mit der Doppelmarkierung durchgeführten Versuch und ein Minimum um 14.00 Uhr in beiden Versuchen. Eine Erklärung für die dabei gefundene signifikante Diskrepanz im Betrag der Markierungsindices der Maxima beider Versuche konnten sie nicht geben, stellten jedoch weitere Versuche zur Klärung in Aussicht (in Vorbereitung). Für den Influx in die S-Phase, d. h. den Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen wurde ein Maximum um 23.00 Uhr und ein Minimum um 11.00 Uhr gefunden, für den Efflux aus der S-Phase, d. h. den Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen wurde ein Maximum um 4.00 Uhr und ein Minimum um 16.00 Uhr bestimmt. Die zu allen Zeitpunkten gemessenen Beträge von Influx in die S-Phase und Efflux aus der S-Phase waren nicht gleich, das Verhalten des Zellflusses in die S-Phase spiegelte sich um die S-Phasen-Dauer verschoben in dem Zellfluß aus der S-Phase wieder. Die aus den Berechnungen mittels des Zellflusses in und aus der S-Phase gewonnenen Verläufe von Markierungs- und Mitoseindex stimmen mit den experimentell gefundenen Kurvenverläufen gut überein und zeigen ebenfalls mit zeitlicher Verschiebung und einer gewissen Dämpfung diese tageszeitlichen Schwankungen, die nach der Theorie der Autoren in der G_1-Phase gedämpft werden. Die Ergebnisse werden als signifikant beschrieben. Hiermit haben GRUBE et al. zum ersten Mal tageszeitliche Schwankungen des Zellflusses in und aus der S-Phase für die Epidermis festgestellt.

TVERMYR (1972) untersuchte die Rückenepidermis männlicher haarloser Mäuse im 1-Stunden-Intervall hinsichtlich folgender Parameter: Den Mitose- und ^{3}H-Markierungsindex, sowie durch zweimalige ^{3}H-TdR-Injektion im 3-Stunden-Abstand, den Zellfluß in und aus der S-Phase sowie die Dauer der G_2- und S-Phase. Dabei fand er für den Mitoseindex ein Maximum zwischen 4.00 Uhr und 7.40 Uhr und ein Minimum zwischen 14.00 Uhr und 17.40 Uhr, für den ^{3}H-Markierungsindex ein Maximum um 1.00 Uhr und ein Minimum zwischen 14.00 Uhr und 17.00 Uhr. Für den Influx in die S-Phase fand sich ein Maximum zwischen 20.00 und 23.00 Uhr und ein Minimum zwischen 10.00 und 13.00 Uhr. Für den Efflux aus der S-Phase bestimmte der Autor ein Maximum zwischen 5.00 Uhr und 8.00 Uhr und ein Minimum zwischen 14.00 Uhr und 17.00 Uhr. Die S-Phasen-Dauer zeigte ein Maximum (von 12,5 Std.) zwischen 10.00 und 13.00 Uhr und ein Minimum (von 6,25 Std.) um 5.00 Uhr. Für die G_2-Phasen-Dauer fand sich ein Maximum am Nachmittag und ein Minimum frühmorgens. Damit decken sich die Ergebnisse von TVERMYR größtenteils mit denen von GRUBE et al. (1970). Im Gegensatz zu GRUBE stellte TVERMYR jedoch fest, daß sich der Influx in die S-Phase nicht einige Stunden später im Efflux aus der S-Phase widerspiegelte. Als Ursache für die Schwankungen des ^{3}H-Markierungsindex stellte er einerseits tageszeitliche Schwankungen im Influx in die S-Phase, andererseits tageszeitliche Schwankungen in der S-Phasen-Dauer zur Diskussion. Die Schwankungen des Mitoseindex schrieb er den um die G_2-Phase verschobenen Schwankungen des Effluxes aus der S-Phase zu. Auch er berichtet, daß diese Ergebnisse signifikant seien, ohne allerdings nähere Angaben zu statistischen Berechnungen zu machen.

6.1.4 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Literatur

Die Zusammenstellung der Literatur über tageszeitliche Schwankungen der Proliferation des Darmepithels zeigen ganz offensichtlich Widersprüche. Gemessen wurden in diesen Untersuchungen der Mitoseindex, der Markierungsindex und/oder

der ^{3}H-TdR-Einbau in das Darmepithel von Maus und Ratte als Funktion der Tageszeit. Den Versuchen, bei denen eine tageszeitliche Schwankung der Proliferation des Darmepithels gefunden wurde, stehen Versuche gegenüber, die eine solche tageszeitliche Schwankung nicht nachweisen können. Aber auch die Arbeiten, die für ein Vorliegen tageszeitlicher Schwankungen des Proliferationsverhaltens des Darmepithels sprechen, enthalten deutlich unterschiedliche und widersprüchliche Ergebnisse. Ein gesetzmäßiges tageszeitliches Verhalten der Proliferation der Darmschleimhaut kann aus diesen Versuchen keinesfalls abgeleitet werden. Das ist insofern verständlich, da es sich jeweils um die Untersuchung unterschiedlicher Tierstämme und um unterschiedliche Tierhaltungen in den verschiedenen Instituten handelt. Auffällig ist allerdings, daß in einigen Fällen zweigipflige Kurven gefunden wurden; d. h. es traten zwei Maxima des Mitose- oder Markierungsindex während eines Tagesablaufs auf. In anderen Fällen wurde nur ein Maximum gefunden. In einigen Fällen lag das Maximum des Mitose- bzw. Markierungsindex in der Zeit der körperlichen Ruhe, d. h. während des Tages, in anderen Fällen trat das entsprechende Maximum jedoch nachts auf. In einigen Untersuchungen wurde ein Zusammenhang der Proliferationsaktivität mit der Fütterung der Tiere gefunden, in anderen nicht. Einige Autoren berichten über ein gleichzeitiges Auftreten der Maxima des Mitose- und Markierungsindex und erklären das mit einem gemeinsamen Stimulus für G_1- und G_2-Zellen (SIGDESTAD und LESHER, 1972; AL-DEWACHI et al., 1976).

Auf einen weiteren Punkt muß besonders hingewiesen werden: Bei einer Wiederholung der Versuche durch die gleichen Untersucher zu späteren Zeiten fanden sich Abweichungen von den vorhergegangenen Versuchen, d. h. die Maxima des Mitose- und Markierungsindex oder des ^{3}H-TdR-Einbaus traten zu anderen Tageszeiten auf (SCHEVING et al., 1972). Diese Erfahrung scheint kein Einzelfall zu sein. Auch andere Untersucher fanden bei einer Wiederholung entsprechender Versuche,

daß die Maxima des Mitose- und Markierungsindex zu anderen Tageszeiten gemessen wurden als in den vorhergehenden Versuchen; z. T. traten die Maxima zu den Tageszeiten auf, zu denen vorher die Minima gemessen wurden (Schultze, Camplejohn, persönliche Mitteilung). Auf der anderen Seite fanden SIGDESTAD et al. (1969) und SIGDESTAD und LESHER (1972) ein gleichartiges Verhalten der tageszeitlichen Schwankungen des Mitose- und Markierungsindex sowie des ^{3}H-TdR-Einbaus der Jejunumkryptenepithelien der Maus bei der Wiederholung der Versuche. Diese Autoren konnten sogar durch eine Umkehr des Hell-Dunkel-Rhythmus eine Umkehr der tageszeitlichen Schwankungen der Proliferationsaktivität erreichen.

Ganz allgemein muß darauf hingewiesen werden, daß die Ergebnisse der einzelnen Autoren nur in den wenigsten Fällen statistisch abgesichert wurden.

Nur in zwei Fällen wurden in der oben zitierten Literatur die tageszeitlichen Schwankungen mit Hilfe einer Messung der Zellflußrate in die S-Phase und aus der S-Phase in Abhängigkeit von der Tageszeit durch Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR bzw. zweimalige Gabe von ^{3}H-TdR untersucht, und zwar für die Rückenhaut der Maus (GRUBE et al., 1970; TVERMYR, 1972). GRUBE et al. fanden dabei Unterschiede in der Zellflußrate in und aus der S-Phase zu verschiedenen Tageszeiten. Dabei spiegelte sich das Verhalten der Flußrate in die S-Phase um die S-Phasendauer verschoben im Zellfluß aus der S-Phase wider. Auch der Mitoseindex stimmte mit dem Verhalten der Zellflußrate gut überein und zeigte ebenfalls mit einer entsprechenden Zeitverschiebung tageszeitliche Schwankungen. Auch TVERMYR (1972) konnte einen Unterschied der Zellflußrate in und aus der S-Phase nachweisen, wobei sich allerdings die Veränderung des Influx nicht mit einer Zeitverschiebung im Efflux widerspiegelte.

6.2 Zur Frage einer circadianen Rhythmik in der Proliferation der Jejunumkryptenepithelien der Maus in den vorliegenden Ergebnissen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage, inwieweit tageszeitliche Schwankungen der Proliferation der Kryptenzellen im Jejunum der Maus vorliegen, ebenfalls anhand des Verhaltens der Zellflußrate in und aus der S-Phase im Tagesverlauf mit Hilfe einer Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR untersucht. Dieses Verfahren wurde vor allem deshalb angewendet, weil bei der Bestimmung des Quotienten dieser Flußraten die großen Schwankungen der relativ kleinen absoluten Zahlen rein ^{3}H- und rein ^{14}C-markierter Zellen von Tier zu Tier verkleinert werden. Bekannt sind die großen Schwankungen des Mitoseindex von Tier zu Tier auch bei der gleichen Tageszeit.

6.2.1 Übereinstimmung der vorliegenden Ergebnisse untereinander und mit früheren Untersuchungen

Vor der Diskussion der verschiedenen gemessenen Parameter (Mitoseindex, ^{3}H-TdR-Markierungsindex, ^{14}C-TdR-Markierungsindex, Prozentsatz rein ^{3}H- bzw. rein ^{14}C-markierter Zellen sowie der Quotient davon) soll die Verträglichkeit der gemessenen Werte untereinander sowie ihre Übereinstimmung mit entsprechenden Meßergebnissen früherer Versuche überprüft werden.

Der über den ganzen Tag gemittelte Markierungsindex ist - wie zu erwarten - für ^{3}H-TdR (38,0 %) und ^{14}C-TdR (37,9 %) gleich und stimmt darüber hinaus mit früheren Messungen überein (SCHULTZE et al., 1972: 41,2 %; BURHOLT et al., 1976: 35,9 %), Auch die über den ganzen Tag gemittelte Zellflußrate in die S-Phase (= 5,54 %/h) und aus der S-Phase (= 5,65 %/h) stimmt mit früheren Messungen, die bei dem gleichen Tierstamm jeweils vormittags zwischen 8.00 und 10.00 Uhr durchgeführt wurden, überein (SCHULTZE et al., 1972). Der Quotient $\frac{\text{Gesamtzahl rein 3-H-mark. Zellen}}{\text{Gesamtzahl rein 14-C-mark. Zellen}}$ bzw. $\frac{\text{\% rein 3-H-mark.Zellen}}{\text{\% rein 14-C-mark.Zellen}}$ beträgt im Tagesmittel 1,02. Das bedeutet, es liegt - wie früher schon gezeigt wurde - in der ganzen Krypte steady state Wachstum vor (Maus: SCHULTZE et al.

1972; Ratte: BURHOLT et al., 1976). Auffallend niedrig ist der Mitoseindex mit einem Mittelwert über den ganzen Tag in den vorliegenden Versuchen von 1,44 %. Im Gegensatz dazu betrug der Mitoseindex der Jejunumkryptenepithelien der Maus in den früheren oben zitierten Untersuchungen 2,8 % bzw. 2,0 %. Eine Erklärung für diesen geringen Mitoseindex von 1,44 % kann nicht gegeben werden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden, wie in den früheren Untersuchungen, die Mitose-Stadien von der Prophase bis zur Telophase als Mitosen gezählt. Der geringe Mitoseindex deutet darauf hin, daß die Mitosedauer der Kryptenepithelien der hier untersuchten Tiere kürzer ist. Sie dürfte nicht, wie früher gemessen, ca. 30 Minuten, sondern nur 15 bis 20 Minuten betragen. Die Zellzahl pro Krypte ist mit im Mittel 289 Zellen höher als bei den früheren Versuchen (ca. 200 Zellen pro Krypte).

Insgesamt stimmen die gemessenen Parameter untereinander und mit früheren Messungen gut überein und lassen sich mit einer Zyklusdauer von im Mittel ca. 14 Stunden und einer S-Phasen-Dauer von 7 - 8 Stunden (SCHULTZE et al., 1972) gut in Einklang bringen.

6.2.2 Verhalten der verschiedenen zellkinetischen Parameter als Funktion der Tageszeit

Von den gemessenen Parametern zeigt der Mitoseindex die deutlichsten Abweichungen vom Tagesmittel mit je einem Maximum bei 12.00 und 3.00 Uhr sowie einem Minimum bei 18.00 Uhr. Wie die in den Ergebnissen angegebene Varianzanalyse dieser Werte zeigt, unterscheidet sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % mindestens ein Gruppenmittelwert (Mittelwert des Mitoseindex aller Tiere eines Zeitpunktes) von einem anderen im Verlauf der Tageszeit gemessenen Gruppenmittelwert.

Sowohl der ^{3}H- als auch der ^{14}C-TdR-Markierungsindex zeigen keine statistisch signifikanten tageszeitlichen Schwankungen (Tabelle 2). Das Gleiche gilt für den Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen.

Für die nur mäßig ausgeprägten Abweichungen des Prozentsatzes rein ^{3}H-markierter Zellen vom Tagesmittel mit höheren Werten bei 12.00 bis 15.00 Uhr und 3.00 Uhr, die in etwa dem Verlauf des Mitoseindex entsprechen, hat die Varianzanalyse ebenfalls ergeben, daß mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % sich mindestens ein Gruppenmittelwert von einem anderen im Tagesverlauf gemessenen unterscheidet. Wie Tabelle 2 zeigt, liegt jedoch die Testgröße bei der Varianzanalyse des Prozentsatzes rein ^{3}H-markierter Zellen nur ganz knapp über der Testschranke. Darüber hinaus muß darauf hingewiesen werden, daß sich ca. 30 % aller rein ^{3}H-markierter Zellen bereits in der Mitose befinden und somit die Schwankungen des Mitoseindex repräsentieren. Andererseits bestehen die Mitosen, die als Mitoseindex über den Verlauf des Tages gemessen wurden, zum überwiegenden Anteil aus rein ^{3}H-markierten Mitosen. Bis zum Zeitpunkt 21.00 Uhr sind 90 - 95 % aller Mitosen rein ^{3}H-markiert, zu späteren Zeitpunkten sind es noch 70 - 84 %. D. h. die in der Mitose befindlichen Zellen sind fast ausschließlich rein ^{3}H-markierte Zellen, die die G_2-Phase bereits passiert haben und die gesamte Mitose ausfüllen. Es besteht also zwischen dem Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen und dem Mitoseindex keine Unabhängigkeit. Diese Unabhängigkeit ist aber eine Voraussetzung für die Anwendung der Varianzanalyse.

Der Quotient $\frac{\%\text{ rein }^{3}\text{H-mark. Zellen}}{\%\text{ rein }^{14}\text{C-mark. Zellen}}$ zeigt - wie der Mitoseindex - ein Maximum bei 12.00 Uhr und eines bei 3.00 Uhr sowie ein Minimum bei 18.00 Uhr. Auch hier hat die Varianzanalyse Unterschiede von mindestens einem Gruppenmittelwert zu einem anderen im Tagesverlauf ergeben. Die Maxima, die bei der Bildung des Quotienten deutlicher vom Tagesmittel abweichen als der Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen, sind z. T. darauf zurückzuführen, daß der Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen teilweise die gemessenen Schwankungen des Mitoseindex enthalten. Auf der anderen Seite sind die Kurven der Prozentsätze rein ^{3}H- und rein ^{14}C-markierter Zellen in etwa gegenläufig; d. h. zu den Zeit-

punkten, zu denen der Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen ein Maximum aufweist (12.00 und 3.00 Uhr) befindet sich bei dem Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen ein Minimum.

Von den gemessenen Parametern zeigen demnach nur der Mitoseindex und der Quotient $\frac{\%\text{ rein 3-H-mark. Zellen}}{\%\text{ rein 14-C-mark. Zellen}}$ zu verschiedenen Tageszeiten Abweichungen vom Tagesmittel. Auf die Abhängigkeit dieser beiden Parameter wurde oben bereits hingewiesen. Bei diesen Abweichungen vom Tagesmittel ergibt sich zunächst die Frage, ob es sich hier überhaupt um Tagesrhythmen handelt. Ein Vergleich der jeweils um 9.00 Uhr gemessenen Werte für den Mitoseindex aber auch für den Quotienten $\frac{\%\text{ rein 3-H-mark. Zellen}}{\%\text{ rein 14-C-mark. Zellen}}$ zeigt, daß die Übereinstimmung der beiden 9.00-Uhr-Werte gut ist. Das läßt den Schluß zu, daß es sich hier - falls überhaupt reelle Schwankungen vorliegen - tatsächlich um Tagesrhythmen handelt. Die übrigen gemessenen Parameter zeigen zwischen dem 9.00-Uhr-Wert des ersten und des zweiten Tages eine abfallende Tendenz, niemals eine ansteigende.

Im Folgenden soll auf das tageszeitliche Verhalten der Zellflußrate in und aus der S-Phase und das der Mitosen näher eingegangen werden. Bei der Messung der Zellflußrate am Anfang und Ende der S-Phase werden mit Hilfe der Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR Subpopulationen von Zellen geschaffen. Da sich diese Zellpopulationen einmal am Anfang der S-Phase befinden und zum anderen in der G_2-Phase, handelt es sich jeweils um unterschiedliche Zellen. Die rein ^{3}H-markierten Zellen befinden sich zum Zeitpunkt der ^{3}H-TdR-Injektion am Ende der S-Phase, zum Zeitpunkt der ^{14}C-TdR-Injektion in einem 1-Stunden-Intervall in der G_2-Phase. 30 Minuten später, bei der Tötung der Tiere, sind diese rein ^{3}H-markierten Zellen z. T. noch in der G_2-Phase, z. T. aber befinden sie sich bereits in der Mitose und füllen - wie die Markierung der Mitosen zeigt - praktisch die gesamte Mitosedauer aus. Die Zahl der einmal erzeugten rein ^{3}H-markierten Zellen bleibt konstant. Das

gilt allerdings nur für den Fall, daß keine rein ^{3}H-markierten Zellen absterben oder die Mitose durchlaufen und sich bereits geteilt haben. Für diese beiden Vorgänge gibt es keine Anhaltspunkte. Es wurden keine rein ^{3}H-markierten Nekrosen beobachtet, und es traten keine rein ^{3}H-markierten Zellen mit der halben Kornzahl pro Kern auf. Allerdings ist die Gesamtzahl der rein ^{3}H-markierten Zellen klein. Sie beträgt nur 1/20 aller Kryptenzellen. Daher ist diese Anzahl rein ^{3}H-markierter Zellen für einzelne Krypten starken statistischen Schwankungen unterworfen. Darüber hinaus hängt die Zellzahl in dem 1-Stunden-Intervall aber auch von den Schwankungen der Phasendauern der einzelnen Zellen ab. Das bedeutet, daß die Zahl der rein ^{3}H-markierten Zellen die zellkinetischen Schwankungen der einzelnen Zellen wiedergibt. Dasselbe gilt auch für die rein ^{14}C-markierten Zellen. Dementsprechend variiert der Quotient $\frac{\%\text{ rein 3-H-mark. Zellen}}{\%\text{ rein 14-C-mark. Zellen}}$ bis fast um den Faktor 2, und zwar sowohl für verschiedene Tageszeiten als auch von Tier zu Tier für ein und dieselbe Tageszeit. Angesichts des statistischen Fehlers der relativ kleinen Zellzahl und der Variation von Tier zu Tier ist es unsicher, ob überhaupt reelle Schwankungen des Quotienten $\frac{\%\text{ rein 3-H-mark. Zellen}}{\%\text{ rein 14-C-mark. Zellen}}$ vorhanden sind. Auffallend bleibt jedoch das tageszeitliche Verhalten der beiden Subpopulationen. Wie Abb. 8 und 9 zeigen, lassen die Prozentsätze rein ^{3}H- und rein ^{14}C-markierter Zellen einen gegenläufigen Verlauf über die Tageszeit erkennen. Werden dagegen die Werte für den Quotienten über den Tagesverlauf gemittelt, so erhält man für den Quotienten einen Wert von 1,02. D. h. mit einer großen Anzahl von Krypten und über den gesamten Tagesverlauf verhalten sich die Flußraten der Zellen am Anfang und am Ende der S-Phase gleich. Das bedeutet, daß innerhalb der gesamten Krypte und über das Tagesmittel steady state Wachstum vorliegt.

Was den Mitoseindex angeht, so bietet die hier angewendete Krypten-Quetschtechnik den Vorteil, die genaue An-

zahl der Mitosen pro Krypte durch Auszählen der gequetschten Krypte zu ermitteln. Das bedeutet, es ist keine Korrektur für geometrisch unterschiedliche Verhältnisse nötig, wie sie bei der Verwendung von histologischen Schnitten erforderlich ist. Der Mitoseindex ist mit 1,44 % niedriger als in früheren Untersuchungen gleicher Art an dem gleichen Tierstamm (2,8 % bzw. 2,0 %). Das hat zur Folge, daß die Zahl der Mitosen pro Krypte besonders großen statistischen Schwankungen unterworfen ist. Im Mittel werden nur ca. 4 Mitosen in einer Krypte von 300 Zellen gezählt. Aus diesem Grund ist für die Werte des Mitoseindex in Abb. 5 der Poisson-Fehler der ausgezählten Zahl der Mitosen größer als die Schwankungen von Tier zu Tier und somit auch größer als das eingezeichnete Konfidenzintervall von 90 %. Die Fehlerbreite der Mittelwerte ist daher im Falle der Mitoseindices mit noch größerer Zurückhaltung zu betrachten als der Quotient der Zellflußrate am Anfang und Ende der S-Phase. Der Kurvenverlauf des Mitoseindex zeigt angedeutet ein Maximum bei 12.00 Uhr und eines bei 3.00 Uhr und ein Minimum bei 18.00 Uhr. In Anbetracht des relativ großen Fehlers ist jedoch nicht mit Sicherheit zu entscheiden, ob diese Abweichungen vom Tagesmittel tatsächlich reell sind.

Das Fehlen eines eindeutigen Nachweises tageszeitlicher Schwankungen der zellkinetischen Parameter für die Jejunumkryptenepithelien der Maus in der vorliegenden Arbeit stimmt mit den oben genannten Untersuchungen von PILGRIM et al. (1963; 1965) überein. Diese Autoren konnten im Gegensatz zu anderen Geweben bei Jejunumkrypten der Maus keine tageszeitliche Schwankung der Proliferation nachweisen. Allerdings waren bei diesen Untersuchungen die Zeitintervalle von 6 Stunden zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten im Tagesverlauf doppelt so lang wie in der vorliegenden Arbeit. Das könnte - obwohl es nicht sehr wahrscheinlich ist - der Grund sein, daß Abweichungen des Mitose- oder Markierungsindex dem Nachweis zufällig entgangen sind. Unter der Annahme, daß es sich bei den in der vorliegenden

Arbeit gemessenen Abweichungen des Mitoseindex und des Quotienten $\frac{\%\text{ rein }^3\text{H-mark. Zellen}}{\%\text{ rein }^{14}\text{C-mark. Zellen}}$ um reelle Abweichungen vom Tagesmittel handelt, liegt eine deutliche Diskrepanz zu den schon oben erwähnten Untersuchungen von SIGDESTAD et al. (1969) vor. Diese Autoren fanden ein einziges sehr deutliches Maximum des Mitose- und Markierungsindex sowie des ^{3}H-TdR-Einbaus um 3.00 Uhr und ein entsprechendes Minimum um 15.00 Uhr (Faktor 2 Unterschied zwischen Maximum und Minimum).

Der in der vorliegenden Arbeit eingeschlagene Weg, tageszeitliche Schwankungen der Proliferationsaktivität der Kryptenepithelien im Dünndarm der Maus mit Hilfe der Messung der Zellflußrate am Anfang und Ende der S-Phase nachzuweisen, hat nicht zu einer eindeutigen Aussage geführt. Hier muß berücksichtigt werden, daß der Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen zum Teil die Abweichung des Mitoseindex vom Tagesmittel wiedergibt, da ein Drittel der rein ^{3}H-markierten Zellen sich bereits in der Mitose befindet. Auf der anderen Seite wird bei der Bildung der Quotienten durch den Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen dividiert, der sich im Tagesverlauf gegenläufig zum Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen verhält. Dieses Verhalten der rein ^{14}C-markierten Zellen kann aber rein zufällig sein. Daher ist nicht mit Sicherheit zu sagen, ob die Abweichungen des Quotienten vom Tagesmittel reell sind.

Der relativ große Arbeitsaufwand, der die Bestimmung der unterschiedlichen zellkinetischen Parameter auf Doppelschicht-Autoradiogrammen einzelner gequetschter Krypten erfordert, beschränkt von dieser Seite her die bessere statistische Absicherung der Ergebnisse durch größeres Zahlenmaterial.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die Proliferationsaktivität der Kryptenepithelien des Jejunum der Maus tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Die zur Klärung dieser Frage bisher veröffentlichten experimentellen Ergebnisse sind widersprüchlich. Die in den Untersuchungen der Literatur gemessenen zellkinetischen Parameter der Kryptenepithelien des Dünndarms der Maus, Mitoseindex, Markierungsindex oder ^{3}H-TdR-Einbau variieren je nach Tageszeit bei einigen Autoren bis zu einem Faktor 2. Andere Autoren können keine diurnale Rhythmik finden. Die Schwierigkeit dieser Untersuchungen liegt in den großen Schwankungen des Mitoseindex und Markierungsindex von Tier zu Tier, auch bei der gleichen Tageszeit.

Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit neben den üblichen zellkinetischen Parametern die Zellflußrate in die S-Phase und aus der S-Phase gemessen, und zwar mit Hilfe einer Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR. Die Tiere erhielten zu diesem Zweck eine 1. Injektion von ^{3}H-TdR und eine Stunde später eine 2. Injektion von ^{14}C-TdR. Die zum Nachweis der unterschiedlich markierten Zellen verwendete Doppelschicht-Autoradiographie erlaubt die quantitative Unterscheidung rein ^{3}H- und rein ^{14}C-markierter Zellen. Durch die Bildung des Quotienten der Flußraten $\frac{\%\text{ rein 3-H-markierte Zellen}}{\%\text{ rein }^{14}\text{-C-markierte Zellen}}$ werden die viel größeren Schwankungen der relativ kleinen Zahlen rein ^{3}H- und rein ^{14}C-markierter Zellen von Tier zu Tier verringert.

Folgende zellkinetische Parameter wurden in Abhängigkeit von der Tageszeit gemessen: Gesamtzellzahl pro Krypte, ^{3}H- und ^{14}C-TdR-Markierungsindex, Mitoseindex, Prozentsatz rein ^{3}H- und rein ^{14}C-markierter Zellen und der Quotient der letzten beiden Größen, der Flußraten. Die Werte dieser Meßdaten stimmen gemittelt über den ganzen Tag untereinander und mit den Ergebnissen früherer Arbeiten (SCHULTZE et al., 1972) gut überein. Darüber hinaus stimmen sie mit der

in anderen Untersuchungen gemessenen Zyklusdauer von ca. 14 Stunden und einer S-Phasendauer von 7 - 8 Stunden überein.

Eine deutliche Abweichung vom Tagesmittel, und zwar je ein Maximum um 12.00 und 3.00 Uhr und ein Minimum um 18.00 Uhr wurde lediglich für den Mitoseindex, den Quotienten $\frac{\text{rein 3-H-markierte Zellen}}{\text{rein 14-C-markierte Zellen}}$ und viel weniger deutlich für den Prozentsatz rein 3-H-markierter Zellen gefunden.

Die für die Abweichung des Mitoseindex vom Tagesmittel relativ gute Absicherung durch die in der vorliegenden Arbeit angewandte Varianzanalyse wird jedoch relativiert durch den großen statistischen Fehler, mit dem die kleinen Zahlenwerte des Mitoseindex belastet sind. Pro Krypte von ca. 300 Zellen werden im Mittel nur 4 Mitosen gezählt. In Anbetracht dieses Fehlers, der bei der Varianzanalyse nicht berücksichtigt wird, ist nicht mit Sicherheit zu entscheiden, ob die Abweichungen des Mitoseindex vom Tagesmittel tatsächlich reell sind.

Bei der statistischen Überprüfung der gemessenen Prozentsätze rein ^{3}H-markierter Zellen mit Hilfe der hier angewendeten Varianzanalyse liegt die Testgröße nur knapp oberhalb der Testschranke. Darüber hinaus ist diese Meßgröße nicht unabhängig vom Mitoseindex. 30 % aller rein ^{3}H-markierten Zellen befinden sich bereits in der Mitose und repräsentieren somit die Schwankungen des Mitoseindex.

Der Quotient $\frac{\text{\% rein } ^{3}\text{H-markierte Zellen}}{\text{\% rein } ^{14}\text{C-markierte Zellen}}$ zeigt deshalb eine größere Abweichung vom Tagesmittel als der Prozentsatz rein ^{3}H-markierter Zellen, weil hier das Verhältnis der Prozentsätze rein ^{3}H- zu rein ^{14}C-markierten Zellen gebildet wird, und der Prozentsatz rein ^{14}C-markierter Zellen sich im Tagesverlauf zu dem der rein ^{3}H-markierten Zellen gegenläufig verhält. Dieses Verhalten des Prozentsatzes rein ^{14}C-markierter Zellen dürfte aber rein zufällig sein.

Wie in der Diskussion ausführlich dargestellt wird, läßt die Fehlerbreite der gemessenen Werte keine eindeutige Aussage über das Vorliegen tageszeitlicher Schwankungen der Proliferationsaktivität der Kryptenzellen des Jejunum der Maus zu.

Der hier eingeschlagene Weg, das Vorliegen von tageszeitlichen Schwankungen der Proliferation der Dünndarmkrypten der Maus über eine Messung des Quotienten der Zellflußrate in und aus der S-Phase mit Hilfe einer Doppelmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-TdR nachzuweisen, hat somit zu keiner eindeutigen Aussage geführt. Die Messungen müßten statistisch besser abgesichert werden. Trotz des großen Arbeitsaufwandes bei der Auswertung der im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Doppelschicht-Autoradiogramme reicht die statistische Sicherheit für eine eindeutige Aussage nicht aus. Jedenfalls dürften die tageszeitlichen Schwankungen - falls sie überhaupt vorhanden sind - nur klein sein.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

AL-DEWACHI, H.S., WRIGHT, N.A., APPLETON, D.R. and WATSON, A.J.

Studies on the Mechanism of Diurnal Variation of Proliferative Indices in the Small Bowell Mucosa of the Rat.
Cell Tissue Kinet. 9, 459-467 (1976)

ALOV, I.A.

Daily Rhythm of Mitosis and Relationship between Cell Work and Cell Division.
Fed. Proc. 22, 357-362 (1963)

BERTALANFFY, F.

Mitotic Rates and Renewal Times of the Digestive Tract Epithelia in the Rat.
Acta Anatomica 40, 130-148 (1960)

BULLOUGH, W.S.

Mitotic Activity in the Adult Male Mouse mus musculus L. The Diurnal Cycles and their Relation to Waking and Sleeping.
Proc. Roy. Soc. 135, 212-233 (1948)

BURHOLT, D.R., SCHULTZE, B. and MAURER, W.

Mode of Growth of the Jejunal Crypt Cells of the Rat: An Autoradiographic Study Using Double Labelling with 3-H- and 14-C-Thymidine in Lower and Upper Parts of the Crypts.
Cell Tissue Kinet. 9, 107-114 (1976)

BURNS, E.R., SCHEVING, L.E. and TIEN-HU TSAI

Circadian Rhythms in DNA Synthesis and Mitosis in Normal Mice and in Mice Bearing the Lewis Lung Carcinoma.
Europ. J. Cancer, Vol. 15, pp. 233-242 (1979)

GRUBE, D.D., AUERBACH, H. and BRUES, A.M.

Diurnal Variation in the Labelling Index of Mouse Epidermis: A Double Isotope Autoradiographic Demonstration of Changing Flow Rates.
Cell Tissue Kinet. 3, 363-373 (1970)

KLEIN, H. und GEISEL, H.

Zum Nachweis eines 24-Stunden-Rhythmus der Mitosen bei Ratte und Maus.
Klin. Wschr. 25, 662-663 (1947)

LEBLOND, C.P. and STEVENS, C.E.

The Constant Renewal of the Intestinal Epithelium in the Albino Rat.
Anat. Rec. 100, 357-371 (1948)

MÖLLER, U.

Interaction of External Agents with the Circadian Mitotic Rhythm in the Epithelium of the Hamster Cheek Pouch.
J. interdiscipl. Cycle Res., Vol. 9, Number 2, pp. 105-114 (1978)

MÖLLER, U. and LAYSEN, J.K.

The Circadian Variations in the Epithelial Growth of the Hamster Cheek Pouch: Quantitative Analysis of DNA Distribution.
Cell Tissue Kinet. 11, 405-413 (1978)

PILGRIM, C., ERB, W. and MAURER, W.

Diurnal Fluctuations in the Numbers of DNA SYNTHESIZING NUCLEI in Various Mouse Tissues.
Nature. Vol. 199, No. 4896, p. 863 only, August 31, 1963

PILGRIM, C., LENNARTZ, K.J., WEGENER, K., HOLLWEG, S. und MAURER, W.

Autoradiographische Untersuchungen über tageszeitliche Schwankungen des H-3-Index und des Mitoseindex bei Zellarten der ausgewachsenen Maus, des Ratten-Fetus sowie bei Ascites-Tumorzellen.
Zeitschrift für Zellforschung, 68, 138-154 (1965)

POTTEN, CH.S., AL-BARWARI, S.E., HUME, W.J. and SEARLE, J.

Circadian Rhythms of Presumptive Stem Cells in three Different Epithelia of the Mouse.
Cell Tissue Kinet. 10, 557-568 (1977)

SACHS, L.

"Einfache Varianzanalyse" in:
Angewandte Statistik, Herausgeber: L. Sachs
Springer-Verlag, 386-395 (1974)

SAKATA, T. and HAMATE, H.

Presence of Circadian Rhythm in the Mitotic Index of the Ruminal Epithelium in Sheep.
Research in Veterinary Science, 24, 1-3 (1978)

SCHEVING, L.E., BURNS, E.R. and PAULY, J.E.

Circadian Rhythms in Mitotic Activity and ^{3}H-Thymidine Uptake in the Duodenum: Effect of Isoproterenol on the Mitotic Rhythm.
Am. J. Anat. 135, 311-318 (1972)

SCHEVING, L.E., BURNS, E.R., PAULY, J.E. and TIEN-HU TSAI

Circadian Variation in Cell Division of the Mouse Alimentary Tract, Bone Marrow and Corneal Epithelium. Anat. Rec. 191, 479-486 (1978)

SCHMEER, A.C.

Preservation and long-term Storage of Feulgen-stained Mouse Tissues for Subsequent Autoradiography. Stain Technology 46, 27 (1971)

SCHULTZE, B., HAACK, V., SCHMEER, A.C. and MAURER, W.

Autoradiographic Investigation on the Cell Kinetics of Crypt Epithelia in the Jejunum of the Mouse. Cell Tissue Kinet. 5, 131-145 (1972)

SIGDESTAD, C.P., BAUMAN, J. and LESHER, S.W.

Diurnal Fluctuations in the Number of Cells in Mitosis and DNA Synthesis in the Jejunum of the Mouse. Experimental Cell Research, 58, 159-162 (1969)

SIGDESTAD, C.P. and LESHER, S.W.

Photo-reversal of the Circadian Rhythm in the Proliferative Activity of the Mouse Small Intestine. J. Cell. Physiol. 78, 121-126 (1971)

SIGDESTAD, C.P. and LESHER, S.W.

Circadian Rhythm in the Cell Cycle Time of the Mouse Intestinal Epithelium. J. interdiscipl. Cycle Res., Vol. 3, Number 1, pp. 39-46 (1972)

TANNOK, J.

A Comparison of the Relative Efficiencies of Various Metaphase Arrest Agents. Experimental Cell Research, 47, 345-356 (1967)

TVERMYR, E.M.C.

Circadian Rhythms in Hairless Mouse Epidermal DNA-Synthesis as Measured by Double Labelling with H3-Thymidine (H3 Tdr.). Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 11, 43-54 (1972)

Zeitpunkt	Zahl der Tiere	Gesamt-Zellzahl	Unmark. Zellen	rein ^{3}H-mark.Zellen	rein ^{14}C-mark.Zellen	doppelt mark.Zellen	unmark. Mitosen	rein ^{3}H-mark.Mitosen	% rein ^{3}H-mark.Zellen	% rein ^{14}C-mark.Zellen	% r.^{3}H-m.Z.* / % r.^{14}C-m.Z.	^{3}H-Markierungsindex (%)	^{14}C-Markierungsindex (%)	Mitoseindex
9.00	4	3577 ± 361,8	1948 ± 121,0	169 ± 45,3	257 ± 48,8	1161 ± 150,5	2 ± 0,6	41 ± 9,3	5,6 ± 0,8	7,0 ± 0,9	0,8 ± 0,1	37,7 ± 1,8	39,2 ± 2,0	1,2 ± 0,2
12.00	4	3028 ± 162,1	1641 ± 93,7	148 ± 16,4	152 ± 14,2	1024 ± 90,2	5 ± 2,2	60 ± 6,3	6,8 ± 0,4	5,0 ± 0,3	1,4 ± 0,1	40,5 ± 2,5	38,8 ± 2,3	2,1 ± 0,1
15.00	4	2918 ± 139,7	1681 ± 76,7	152 ± 10,7	186 ± 21,3	852 ± 50,7	4 ± 1,3	43 ± 3,5	6,7 ± 0,2	6,4 ± 0,5	1,1 ± 0,1	35,9 ± 0,9	35,5 ± 1,2	1,6 ± 0,1
18.00	3	2764 ± 163,8	1503 ± 86,6	110 ± 19,5	188 ± 37,7	939 ± 133,9	2 ± 0,7	22 ± 2,4	4,6 ± 0,7	6,8 ± 1,2	0,7 ± 0,1	38,2 ± 3,7	40,4 ± 3,8	0,8 ± 0,1
21.00	4	2744 ± 227,5	1469 ± 151,0	130 ± 19,1	152 ± 22,9	959 ± 40,0	4 ± 0,3	32 ± 5,9	5,8 ± 0,4	5,4 ± 0,4	1,1 ± 0,1	41,1 ± 1,7	40,8 ± 1,4	1,3 ± 0,2
24.00	3	2347 ± 100,8	1276 ± 53,9	93 ± 15,1	101 ± 17,4	847 ± 40,2	10 ± 4,2	21 ± 6,1	4,9 ± 0,9	4,3 ± 0,8	1,1 ± 0,1	40,9 ± 0,5	40,4 ± 0,4	1,3 ± 0,1
3.00	2	2884 ± 264,5	1635 ± 215,7	148 ± 14,5	124 ± 7,5	925 ± 22,0	8 ± 1,0	45 ± 4,5	6,7 ± 0,1	4,3 ± 0,1	1,6 ± 0,1	38,9 ± 2,1	36,6 ± 2,3	1,8 ± 0,1
6.00	3	2928 ± 198,7	1729 ± 102,5	141 ± 13,3	160 ± 23,1	856 ± 81,4	10 ± 1,7	32 ± 1,0	5,5 ± 0,6	5,5 ± 0,6	1,0 ± 0,1	34,7 ± 1,0	34,6 ± 0,8	1,4 ± 0,2
9.00 (2.V.T.)**	4	2858 ± 118,5	1727 ± 70,2	96 ± 10,8	150 ± 10,8	848 ± 53,5	13 ± 2,3	28 ± 2,6	4,4 ± 0,3	5,3 ± 0,5	0,8 ± 0,1	34,0 ± 0,8	34,9 ± 1,0	1,3 ± 0,2

Tabelle 1: Mittelwerte ± Standardfehler der zu den verschiedenen Zeitpunkten im Tagesverlauf gemessenen zellkinetischen Parameter

* Quotient aus $\frac{\%\text{ rein }^{3}\text{H-markierte Zellen}}{\%\text{ rein }^{14}\text{C-markierte Zellen}}$

** 2.V.T. = 2. Versuchstag

Untersuchte Parameter	Berechnete Größen		
	n	k	$\hat{F}$
Verhältnis $\frac{\%\text{ rein }^3\text{H-mark. Z.}}{\%\text{ rein }^{14}\text{C-mark. Z.}}$	31	9	8,35
Mitoseindex	31	9	4,37
% rein ^{3}H-markierte Zellen	31	9	2,98
^{3}H-Markierungsindex	31	9	2,18
Zellzahl/Krypte	31	9	2,33
% rein ^{14}C-markierte Zellen	31	9	2,03
^{14}C-Markierungsindex	31	9	1,84

Tabelle 2: Prüfgrößen einer einfachen Varianzanalyse

F: Fisher-Verteilung

k = Anzahl der Gruppen (Zeitpunkte)

n = Anzahl der Einzelwerte aller Gruppen zusammen

$\hat{F}$ = Testgröße

Testschranke: $F(k - 1, n - k, \alpha) = F(8,22,0.05)$
$= 2,84$

Tabelle 3: Übersicht über die bisherigen Ergebnisse zur Frage der tageszeitlichen Schwankungen bei anderen Autoren

Autor	Objekt	Ergebnis	
LEBLOND u. STEVENS, 1948	Ratten, Ileum und Duodenum	Mitoseindex konstant	
BERTALANFFY, 1960	Ratten, Zylinderepithel des Darmes	Mitoseindex konstant	
PILGRIM u. MAURER, 1963/65	Mäuse, Jejunumkryptenepithel	Mitoseindex konstant ^{3}H-Markierungsindex konstant Anzahl Silberkörner/Kern konstant	
BULLOUGH, 1948	Mäuse, Duodenalmucosa	Mitoseindex:	Maximum 14.00 Minimum 10.00 u. 22.00
		Körperaktivität:	Maximum 10.00 u. 22.00 Minimum 14.00 u. 6.00
SIGDESTAD et al., 1969	Mäuse, Jejunumkryptenepithel	Mitoseindex:	Maximum 3.00 Minimum 15.00
		^{3}H-Markierungsindex:	Maximum 3.00 Minimum 15.00
		^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 24.00 - 3.00 Minimum 15.00
SIGDESTAD u. LESHER, 1971	Mäuse, Jejunumkryptenepithel (entgegengesetzter Hell-Dunkel-Rhythmus)	Mitoseindex:	Maximum 15.00 Minimum 3.00
		^{3}H-Markierungsindex:	Maximum 15.00 Minimum 3.00
		^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 15.00 Minimum 3.00
SCHEVING et al., 1972	Ratten, Duodenum	Mitoseindex:	Maximum 12.00 - 15.00 Minimum 18.00 - 6.00
		^{3}H-Markierungsindex:	Maximum 8.00 - 18.00 Minimum 19.00 - 1.00
	Mäuse, Duodenum, nach Kochsalzinjektion	Mitoseindex:	Maximum 9.00 Minimum 17.00
	Mäuse, Duodenum, nach Isoproterenolinjektion	Mitoseindex konstant	

Autor	Objekt	Ergebnis
SIGDESTAD u. LESHER, 1972	Mäuse, Jejunumkryptenepithel	3.00: Generationszeit verkürzt G_1-Phase verkürzt S-Phase verlängert Mitosedauer verlängert 3-H-Markierungsindex erhöht 3-H-TdR-Einbaurate erhöht 15.00: Generationszeit verlängert G_1-Phase verlängert S-Phase verkürzt Mitosedauer verkürzt 3-H-Markierungsindex erniedrigt 3-H-TdR-Einbaurate erniedrigt
AL-DEWACHI et al., 1976	Ratten, Jejunumkrypten	Mitoseindex: Maximum 15.00 Minimum 1.00 ^{3}H-Markierungsindex: Maximum 15.00 Minimum 3.00 - 5.00
POTTEN et al., 1977	Mäuse, Dünndarmkrypten	Mitoseindex: Maximum 6.00 Minimum 18.00 ^{3}H-Markierungsindex: Maximum 24.00 - 3.00 Minimum 9.00 - 15.00
BURNS et al., 1978	Mäuse, Duodenum	^{3}H-TdR-Einbaurate: Maximum 5.00 Minimum 14.00
SAKATA u. TAMATE, 1978	Schafe, Pansenepithel, 1. Versuch	Mitoseindex: Maximum 16.00 - 0.00 Minimum 8.00 - 12.00
	Schafe, Pansenepithel, 2. Versuch (Fütterungszeit geändert)	Mitoseindex: Maximum 12.00 - 4.00 Minimum 8.00
SCHEVING et al., 1978	Mäuse, Jejunum	^{3}H-TdR-Einbaurate: Maximum 8.00 Minimum 17.00
BULLOUGH, 1948	Mäuse, Ohrepidermis	Mitoseindex: Maximum 14.00 u. 6.00 Minimum 10.00 u. 22.00
	Mäuse, Rückenepidermis	Mitoseindex: Maximum 14.00 u. 6.00 Minimum 10.00 u. 22.00
	Mäuse, Oesophagus	Mitoseindex: Maximum 14.00 u. 6.00 Minimum 10.00 u. 22.00
	Mäuse Epididymis	Mitoseindex: Maximum 14.00 u. 4.00 Minimum 10.00 u. 22.00
	Mäuse, Lymphknoten, Testis	Mitoseindex konstant

Autor	Objekt	Ergebnis	
BERTALANFFY, 1960	Ratten, Epithel von Lippe, Mund, Zunge, Oesophagus und Anus	Mitoseindex:	Maximum am späten Nachmittag und Abend Minimum in den frühen Morgenstunden
	Ratten, Epithel des Magens	Mitoseindex konstant	
PILGRIM u. MAURER, 1963/65	Mäuse, Plattenepithel von Zunge, Vormagen und Oesophagus, Epidermis der Bauchhaut	Mitoseindex:	Maximum 6.00 Minimum 11.30 - 23.30
		^{3}H-Markierungsindex:	Maximum 18.00 - 19.00 Minimum 11.00 - 12.00
		Anzahl Silberkörner/Kern konstant	
	Mäuse, Plattenepithel der Ohrmuschel	Mitoseindex:	Maximum 18.00 Minimum 11.30 - 23.30
		^{3}H-Markierungsindex:	Maximum 18.00 - 19.00 Minimum 11.00 - 12.00
		Anzahl Silberkörner/Kern konstant	
	Mäuse, Malpighi'sche Körperchen der Milz	Mitoseindex:	Kein Maximum Minimum 11.30 - 23.30
		^{3}H-Markierungsindex:	Maximum 18.00 - 19.00 Minimum 11.00 - 12.00
		Anzahl Silberkörner/Kern konstant	
	Mäuse, Tubuluszellen der Niere	Mitoseindex konstant	
		^{3}H-Markierungsindex konstant	
		Anzahl Silberkörner/Kern konstant	
	Ratten, setale Zellarten	Mitoseindex konstant	
	Mäuse, Ascites-Tumorzellen	^{3}H-Markierungsindex konstant	
POTTEN et al., 1977	Mäuse, Rückenhaut und Zunge	^{3}H-Markierungsindex:	Maximum 3.00 Minimum 12.00 - 18.00
BURNS et al., 1978	Mäuse, Milz	^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 20.00 Minimum 8.00
	Mäuse, Thymus	^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 2.00 Minimum 14.00
	Mäuse, Knochenmark	^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 2.00 Minimum 8.00
	Mäuse, Leber	^{3}H-TdR-Einbaurate konstant	
	Mäuse, Cornea	Mitoseindex:	Maximum 8.00 Minimum 23.00

Autor	Objekt	Ergebnis	
MÖLLER, 1978	Hamster, Backentaschenepithel	Mitoseindex:	Beeinflussung durch Störfaktoren, z. B. Geräusche, unvorsichtige Behandlung der Tiere, 3-H-TdR-Injektion
MÖLLER u. LARSEN, 1978	Hamster, Backentaschenepithel	G_1-Phase-Zellen:	Maximum 21.50 kein Minimum
		S-Phase-Zellen:	Maximum 5.20 kein Minimum
		(G_2+M)-Phase-Zellen:	Maximum 9.50
		^{3}H-Markierungsindex:	Maximum 5.00 Minimum 18.00
SCHEVING et al., 1978	Ratten, Oesophagus u. Magenfundus	^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 2.00 - 5.00 Minimum 17.00
	Ratten, Duodenum	^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 12.00 - 15.00 Minimum 20.00 - 23.00
	Ratten, Rektum	^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 8.00 - 14.00 Minimum 23.00
	Ratten, Zunge	^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 2.00 Minimum 14.00
	Ratten, Knochenmark	^{3}H-TdR-Einbaurate:	Maximum 11.00 - 14.00 Minimum 20.00 - 23.00
	Ratten, Cornea	Mitoseindex:	Maximum 5.00 - 11.00 Minimum 11.00 - 2.00
GRUBE et al., 1970	Mäuse, Rückenepidermis	^{3}H- bzw. ^{14}C-Markierungsindex:	
		1. Versuch	Maximum 4.00 Minimum 14.00
		2. Versuch	Maximum 23.00 - 7.00 Minimum 14.00
		% rein ^{3}H-mark. Zellen:	Maximum 23.00 Minimum 11.00
		% rein ^{14}C-mark. Zellen:	Maximum 4.00 Minimum 16.00
TVERMYR, 1972	Mäuse, Rückenepidermis	Mitoseindex:	Maximum 4.00 - 7.40 Minimum 14.00 - 17.40
		^{3}H-Markierungsindex:	Maximum 1.00 Minimum 14.00 - 17.00
		Influx in die S-Phase:	Maximum 20.00 - 23.00 Minimum 10.00 - 13.00
		Efflux aus der S-Phase:	Maximum 5.00 - 8.00 Minimum 14.00 - 17.00
		S-Phasen-Dauer:	Maximum 10.00 - 13.00 Minimum 5.00
		G_2-Phasen-Dauer:	Maximum nachmittags Minimum morgens

Herrn Professor Dr. A. M. Kellerer möchte ich an dieser Stelle für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut danken.

Besonders danke ich Frau Professor Dr. B. Maurer-Schultze für die Überlassung des Themas, für ihren ständigen Rat bei Planung, Ausführung und Diskussion der Versuche und für ihre Unterstützung bei der Ausarbeitung des Manuskriptes.

Herrn Professor Dr. W. Maurer danke ich für seine Beratung in der Diskussion, Herrn U. Mäder für seine Unterstützung bei der statistischen Überprüfung der Ergebnisse.

Nicht zuletzt bin ich Herrn R. Krug, Frau U. Trautmann, Frau H. Zeis und Frau E. Fromke dankbar für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche und der Herstellung der Autoradiogramme, ebenso Frau C. Wistuba bei der Versuchsplanung und Versuchsdurchführung.

L e b e n s l a u f

Am 1. März 1955 wurde ich als erstes Kind des Maschinenbauingenieurs Manfred Herterich, geboren am 26. 03. 1928, und der Sekretärin Johanna Herterich, geborene Weber, geboren am 8. 03. 1934, in Stuttgart geboren.

1959 zogen meine Eltern nach Eltingshausen, Landkreis Bad Kissingen, in Bayern, um und von 1961 bis 1965 besuchte ich die dortige Volksschule. Im September 1965 trat ich in die 5. Klasse des Neusprachlichen Gymnasiums in Bad Kissingen ein und legte an dieser Schule 1974 mein Abitur ab.

Im Sommersemester 1975 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, wo ich am 06. 05. 1981 die Ärztliche Prüfung bestanden habe.

Mit meiner experimentellen Promotionsarbeit begann ich im Frühjahr 1978 bei Prof. Dr. med. B. Maurer-Schultze am Institut für Medizinische Strahlenkunde in Würzburg.

Seit 15. Mai 1981 bin ich als Assistenzärztin in der Gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung der Missionsärztlichen Klinik in Würzburg beschäftigt.

Würzburg, im Oktober 1981

Gisela Herterich

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80